Aus dem Pharmakologischen Institut
der Freien Universität Berlin
Direktor: Professor Dr. med. Hans Herken

ÜBER DIE WIRKUNGEN VON AESCIN AUF MÄUSE ASCITES-TUMORZELLEN

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Ingeborg Hein
aus Kaiserswaldau/Riesengeb.

1971

Aus dem Pharmakologischen Institut
der Freien Universität Berlin
Direktor: Professor Dr. med. Hans Herken

ÜBER DIE WIRKUNGEN VON AESCIN AUF MÄUSE ASCITES-TUMORZELLEN

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Ingeborg Hein
aus Kaiserswaldau/Riesengeb.

Referent: Professor Dr. med. Franz von Bruchhausen

Korreferent: Professor Dr. med. Hans Herken

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche der Freien Universität Berlin.

Promoviert am: 1.11.1971

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

A. EINLEITUNG 1

B. MATERIAL UND METHODEN 4

C. ERGEBNISSE

1. Glukoseaufnahme in Ascites-Tumorzellen unter Aescin 24

2. Aescinwirkung auf die Glykolyse .. 28

3. Glukose- und Pyruvatverwertung unter Aescin 37

4. Atmung der Ascites-Tumorzellen unter Aescin 45

5. Elektronenoptische Aufnahmen einer Ascites-Tumorzelle nach Aescinbehandlung 48

6. Auswirkungen von Aescin auf das Tumorwachstum 53

D. DISKUSSION 57

E. ZUSAMMENFASSUNG 67

F. LITERATURVERZEICHNIS 69

Digitized by the Internet Archive
in 2026

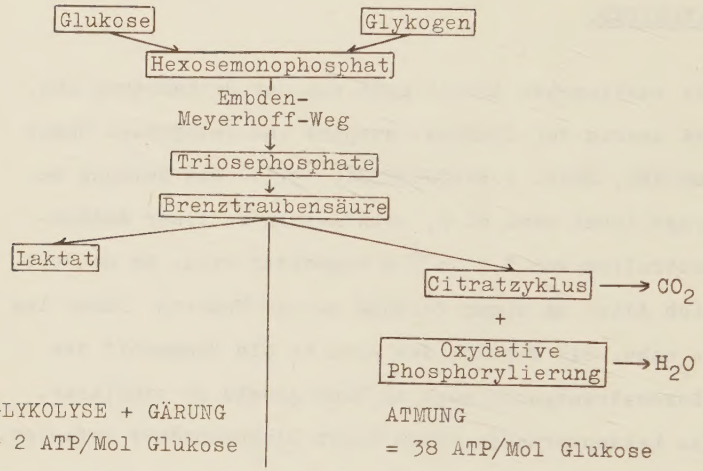
https://archive.org/details/IA41547205_0078

A. EINLEITUNG

Die vorliegende Arbeit geht von der Beobachtung aus, daß Aescin den Glukosetransport ins Fettgewebe hemmt (GRUBER, HEIN, v.BRUCHHAUSEN; 1971). Die Hemmung beträgt dabei etwa 80 %, wenn Aescin in einer Endkonzentration von 3×10^{-4} M zugesetzt wird. Es handelt sich dabei um einen Vorgang an der Membran. Daher lag es nahe, die Wirkung des Aescins als Hemmstoff des Glukosetransports auch an Tumorgewebe zu studieren, das bekanntermaßen einen hohen Glukosebedarf aufweist.

Der tatsächlich starke Glukoseverbrauch der Tumorzelle (NAKAMURA, 1968; WARBURG u. HIEPLER, 1952) wird dadurch erklärt, daß im Energiestoffwechsel die Glykolyse und Gärung zur Energiegewinnung bevorzugt wird (WARBURG u. MINAMI, 1923).

Stoffwechselschema



Nach HOLZER (1963)

Glykolyse: 47.4 kcal Atmung: 686.5 kcal

alkoh.Gärung: 56.1 kcal

In der vorliegenden Arbeit wird daher die Wirkung von Aescin auf den Glukoseverbrauch von Ascitestumorzellen studiert und versucht, die Wirkungen auf die Zellmembran von denjenigen abzugrenzen, die sich direkt am intrazellulären Verbrauch der Glukose abspielen. Allein durch Messung des Glukoseverbrauchs lassen sich Transport und intrazellulärer Stoffwechsel nicht abgrenzen; besonders dann nicht, wenn ein gestörter Glukosetransport vorliegt. Deswegen werden einmal Untersuchungen an Zellhomogenaten und zum anderen mit Pyruvat durchgeführt.

Pyruvat, das allgemein Zellmembranen leicht passieren kann (GUMINSKA, 1970; KLINGENBERG, 1970), kann über die Decarboxylierung schließlich zum Acetyl-CoA werden und damit für die verschiedenen Stoffwechselwege und auch für den Endabbau im Zitronensäurezyklus zur Verfügung stehen. Ein weiterer von manchen Geweben benutzter Weg führt von Pyruvat unter Aufnahme von HCO_3^- (CO_2-Fixation) zur C_4-Säure, der Oxalessigsäure (COOPER et al., 1968; PATEL u. HANSON, 1970). Die Verwertung von Pyruvat wird daher in dieser Arbeit wesentlich an Reaktionen der Pyruvatdecarboxylierung und Pyruvatcarboxylierung untersucht.

Da die Pyruvatcarboxylase zum größten Teil in den Mitochondrien lokalisiert ist (BARGONI u. Mitarbeiter, 1968; BÖTTGER u. WIELAND, 1969), wird im nächsten Schritt die Atmung der Ascitestumorzellen gemessen. In einer elektronenoptischen Aufnahme wird ergänzend das morphologische Bild einer ATZ*, das speziell etwas über die Mitochondrien aussagen soll, dargestellt.

Da Aescin mannigfaltige Funktionseinschränkungen der ATZ verursacht, wird die Angeh- und Vermehrungsfähigkeit nach Aescinvorbehandlung untersucht. Gleichzeitig wird zum Abschluß geprüft, ob tägliche s.c.-Aescininjektionen an tumortragende Mäuse eine Auswirkung auf das Tumorwachstum zeigen.

* Ascitestumorzelle(n)

B. MATERIAL UND METHODEN

I. Benutztes Material

1. Aescin

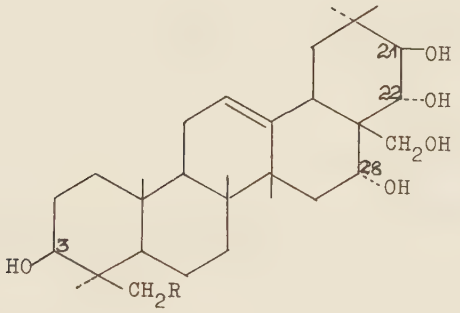
Nach WULFF u. TSCHESCHE (1969) stellt Aescin ein komplexes Gemisch dar, dessen Einzelverbindungen ein gemeinsames Bauschema haben.

Es enthält ein hochhydroxyliertes Triterpenderivat (Protoaescigenin und Barringtogenol), das esterartig am C_{21} Angelica- bzw. Tiglinsäure und an C_{22} vorwiegend Essigsäure enthält. Über die OH-Gruppe an C_3 ist eine D-Glucuronsäure glykosidisch gebunden, die in Stellung 2 und 4 zwei Moleküle D-Glukose trägt; dabei kann eine D-Glukose durch D-Xylose oder D-Galaktose ersetzt sein.

Geht man davon aus, daß im Aescin 2 Aglykone, Protoaescigenin und Barringtogenol C und drei verschiedene Zuckerketten vorliegen, so ergeben sich 6 verschiedene Aescinole. Wenn alle 6 Typen die im Aescin gefundenen Variationen der Säurereste enthalten, ergeben sich für das Gemisch "Aescin" eine Anzahl von über 30 Einzelverbindungen.

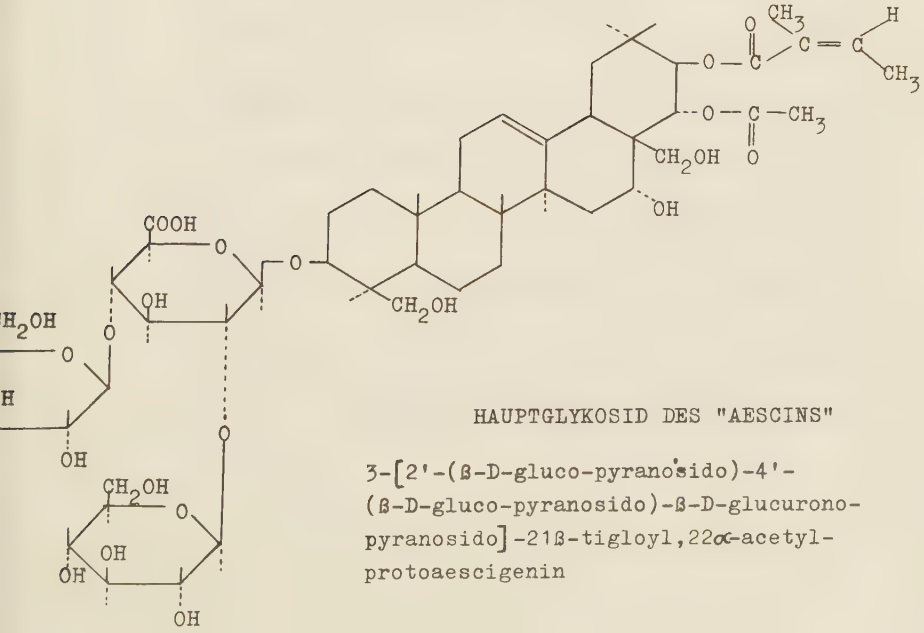
Das von uns verwendete wasserlösliche Aescin wurde von der Fa. Madaus, Köln bezogen und liegt als röntgen-amorphe Substanz vor. Das Molekulargewicht beträgt 1140.

Die Formel sieht wie folgt aus:



R = OH ——— PROTOAESCIGENIN

R = H ——— BARRINGTOGENOL C



HAUPTGLYKOSID DES "AESCINS"

3-[2'-(ß-D-gluco-pyranosido)-4'-(ß-D-gluco-pyranosido)-ß-D-glucurono-pyranosido]-21ß-tigloyl,22α-acetyl-protoaescigenin

2. Mäuse

Zur Züchtung der Ascites-Tumorzellen wurden 18-23 g schwere weibliche Albinomäuse Stamm: N.M.R.I. (Züchter: G.Schwenke, Nauheim) verwendet. Als Nahrung diente Leitungswasser und Altromin R-Trockenfutter der Fa. Altrogge.

3. Ascites-Tumorzellen (ATZ)

Es wurden Ascites-Tumorzellen eines Yoshida-Sarcoms verwendet, die seit 3 Jahren an Mäuse adaptiert waren (von Dr.Liss, Klinische Chemie, Klinikum Berlin zur Verfügung gestellt worden). Die Tumorzellen wurden 7 Tage nach der Übertragung auf Mäuse verwendet. Für die Übertragung wurden 0,1 ml NaCl phys. mit 0,1 ml frisch entnommenem Ascites pro Maus peritoneal inokuliert. Der Bauch der betreffenden Maus war vorher mit verdünnter Incidin-Lösung gesäubert worden. Am 6.-8. Tag nach der Inokulation wurden die ATZ der dekapitierten Maus aus dem Bauchraum entnommen und in einem in Eis stehenden großen Zentrifugenglas gesammelt. Nach einmaligem Waschen mit 3o - 4o ml Medium I (siehe nachfolg. Punkt 4) wurden sie bei 3ooo U/min. (Ecco-Zentrifuge) 8 - 1o Min. zentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf einige Ausnahmen verworfen. Die mit Medium (I oder II) aufgeschwemmten Zellen standen für die einzelnen Versuche zur Verfügung.

4. Medien

I. Krebs-Ringer-Lösung (pro 1oo ml)

KCl	35,4 mg	+ 7o ml H_2O (aqua dest.)	durchströmt mit 95 % O_2 5 % CO_2 für 5 Min.
$CaCl_2$	28,2 mg		
$MgSO_4$	29,4 mg		
KH_2PO_4	16,2 mg		
NaCl	692,3 mg		
$NaHCO_3$	21,o mg	+ 3o ml H_2O	

Die getrennt durchströmten Lösungsanteile wurden vereinigt und erneut durchströmt.

II. Krebs-Phosphat-Medium (pro 1oo ml)

NaCl	372,o mg
KCl	19,o mg
$CaCl_2$	15,1 mg
KH_2PO_4	8,7 mg
$MgSO_4$ x 7 H_2O	15,8 mg
o,1 M Phosphatpuffer pH 7,4	1o,o ml
(17,8 g Na_2HPO_4 x 2 H_2O + 2o ml 1 n HCl ad 1 l)	

III. Triäthanolaminphosphat-Puffer (pro 1oo ml)

Triäthanolamin	1oo,o mg
$MgSO_4$	49,2 mg
$KHCO_3$	2o,o mg
KH_2PO_4	91,o mg
Na-Pyruvat	14,8 mg
Na-ATP	48,4 mg

5. Verwendete Substanzen

Nicotinamid-adenin-dinucleotid (NAD^+)
Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat ($NADP^+$)
Adenosintriphosphat-Na_3 (ATP)
D-Glucose
Glucose-6-phosphat-Na (G6P)
Fructose-1,6-diphosphat-Na (FDP)
Phosphoenol-pyruvat-K (PEP)
Na-Pyruvat
Lactatdehydrogenase (Schweineherz, 25 mg/5,o ml)
Hexokinase (Hefe, 2 mg/1,o ml)

bezogen von der Fa. Boehringer, Mannheim

5-Methoxyindol-2-carbonsäure (MICA)

bezogen von der Fa. Fluka AG

Hydroxyd des Hyamins
(=p-(Diisobutyl)-cresoxyäthoxy-äthyl) dimethyl-benzyl-ammoniumhydroxyd)

Scintillationstoluol
4 g PPO (2,5-Diphenyloxazol)
und
50 mg POPOP 1,4-Bis-2-(4-methyl-5-phenyloxazolyl)-benzol
in 1 l Toluol

Fa. Packard Instr. Comp. Inc.

Radioaktive Substanzen

^{14}(U- C)-Glucose:	spez.Aktivität:	2,9 mCi/mmol 16,2 µCi/mg
^{14}(C)-$NaHCO_3$:	spez.Aktivität:	44,4 mCi/mmol 516,o µCi/mg
^{14}(1- C)-Pyruvat:	spez.Aktivität:	27,2 mCi/mmol 245,o µCi/mg

Fa: Radiochemical Centre, Amersham/England

II. Methodische Verfahren

1. Glukosebestimmung im Außenmedium

Die Glukosekonzentration wurde mit der Testkombination von Boehringer & Söhne, Mannheim bestimmt.

a) Versuchsanordnung

In 25 ml Erlenmeyerkolben wurden 1 ml Zellsuspension (Zellen + Medium I), o,5 ml Glukoselösung (15 μmol/ Ansatz gelöst in Medium I) und gegebenfalls o,5 ml Aescinlösung (für eine Endkonzentration von $1o^{-4}$M, $1o^{-5}$M oder 3 x $1o^{-5}$M in aqua dest. gelöst) gegeben. Mit Medium I wurde auf 5 ml Gesamtvolumen aufgefüllt. Die Glukose wurde als letzte Substanz einpipettiert und sofort die Inkubation bei 37° C im Schüttelwasserbad begonnen. Proben von jeweils o,1 ml wurden nach 0, 2o, 4o, 6o und 8o Minuten entnommen. Die Proben wurden in Reagenzgläser mit o,5 ml Perchlorsäure ($HClO_4$: 1,42 ml 70%ig auf 1oo ml H_2O) gegeben.

b) Photometrische Messung

Die Glukosebestimmung beruht auf zwei Enzymreaktionen, deren letzte Anisidin in einen Farbstoff oxydiert. Dieser Farbstoff wird bei 546 nm photometriert. Im einzelnen erhielt jede Probe 3 ml Enzympuffer (Glukoseoxydase + Anisidin). Nach 35 Minuten wurden 3 ml einer 25%igen H_2SO_4 hinzupipettiert (Eingabe nach der Stoppuhr) und die Suspension bei 546 nm photometriert. Nach Feststellung des Reagensleer-

wertes im Vergleich zu Wasser, wurden alle Proben gegen diesen Leerwert gemessen.

c) Rechnungsgang

Eine Standardlösung von 18,2 γ Glukose ergab eine Extinktion von y (nahezu o,2). Dann ergibt sich bei einem Molekulargewicht der Glukose von 180:

$$\mu\text{mol Glukose} = \frac{E \cdot 18{,}2}{y \cdot 180}$$

Zur Standardisierung wurden die Meßwerte jeweils auf das Trockengewicht (oder 1oo mg Protein) der Zellen in der Einzelprobe bezogen.

Für die Errechnung des Glukoseverbrauchs (in µmol) (Abb. 1 + 3) wurden die gemessenen Extinktionen auf halblogarith. Millimeterpapier eingetragen und von einer approximierten Geraden durchzogen. Die zwischen 0 und 6o Minuten auftretende Differenz wurde in µmol umgerechnet.

2. Laktatmessung im Homogenat

Der Laktatgehalt wurde mit der Testkombination der Fa. Boehringer & Söhne, Mannheim (vergl. "Methoden der enzymatischen Analyse" Hrsg.HH.Bergmeyer S.266 uff.) bestimmt.

a) Versuchsanordnung: Behandlung der Proben

Gewaschene Zellen, aufgeschwemmt mit Medium I, wurden zu je 1 ml in Zentrifugengläser pipettiert. In eine Hälfte der Gläser wurden zusätzlich o,5 ml Aescinlösung (1,71 mg/5 ml H_2O für Endkonzentration von 3 x $1o^{-5}$M) zugegeben. Mit Medium wurde auf ein Gesamtvolumen von 5 ml aufgefüllt. Inkubationsdauer 3o Min. im Wasserbad bei 37° C und schwacher Schüttelfrequenz von 6o/Min. Danach wurden die Zellen 5 Min. zentrifugiert und das Sediment mit etwa 3o ml Medium einmal gewaschen und nochmals in einer nicht gekühlten ECCO-Zentrifuge (3ooo U/min.) zentrifugiert. In den meisten Fällen wurde der Überstand der ersten Inkubation verworfen. Die vorbehandelten Zellen wurden mit 2 ml Medium (I) aufgeschwemmt und mit dem Ultraturrax 1 Min. unter standardisierten Bedingungen zerschlagen. Alle Gläser standen während dieser Zeit im Eis. Von dem erhaltenen Homogenat wurden entweder Proben zur Laktatbestimmung nach der ersten Inkubation abgenommen oder es wurde insgesamt für eine weitere zweite Inkubation eingesetzt.

Zugaben zu der zweiten Inkubation: (Endkonzentrationen) o,1 ml $NADP^+$ (5 x $1o^{-4}$M), o,1 ml ATP (2,5 x $1o^{-3}$M) und entweder o,5 ml Glucoselösung (1oμmol/ Ansatz) oder G6P oder FDP oder PEP, stets in stöchiometrisch gleichen Mengen. Die Inkubationsdauer betrug 3o Min., die enzymatischen Reaktionen wurden durch Zusatz von o,2 ml 70%ige $HClO_4$ unterbrochen.

b) Photometrische Messung des Lactatgehalts.

Die photometrische Messung nutzt das Maximum der Absorption bei 340 nm, das reduzierte Pyridinnucleotide gegenüber oxydierten besitzen.

Die Reaktion lautet:

$$\text{Milchsäure} + NAD^+ + \text{Hydrazon} + OH^- \xrightleftharpoons[\text{pH 9,5}]{\text{LDH}} \text{Brenztraubensäure-Hydrazon} + NADH + H_2O$$

Wegen der ungünstigen Lage des Gleichgewichts der Reaktion wurden die entstehenden H^+-Ionen durch einen alkalischen Puffer und Brenztraubensäure mit Hydrazin abgefangen.

Im einzelnen wurden die in der Reaktion unterbrochenen und enteiweißten Proben mit KOH neutralisiert (unter Zuhilfenahme von pH-Papier). Unter Zusatz von Puffer, Enzym, NAD^+ und Hydrazin wurde die Extinktionszunahme bei 34o nm im zeitlichen Verlauf registriert.

Puffer: Hydrazin-Glycin-Puffer, pH 9,5

(7,5 g Glycin + 5,2 g Hydrazinsulfat + o,2 g EDTA-Na_2 in aqua dest. gelöst, 51 ml 2 N NaOH zugesetzt und mit aqua dest. ad 1oo aufgefüllt.)

Küvetteninhalt zur Messung

o,9 ml Puffer
o,8 ml aqua dest.
o,2 ml enteiweißtes Extrakt
in Vergleichsküvette H_2O stattdessen
o,1 ml NAD^+ (4o mg NAD^+/ml)
2o µl Lactatdehydrogenase zur späteren Zugabe

c) Rechengang

Es wird die max. erreichte Extinktion verwendet. Der Berechnung liegt die Differenz der molaren Extinktionen für NADH gegenüber NAD^+ von 6220 $cm^2 \cdot \mu mol^{-1}$ zugrunde.

1 µmol/ml = 622 Skalenteile (1 Skt. = o,o1 Ext.)

Dann entspricht

$$\mu mol\ Laktat = \frac{Skalenteile \cdot Küvetteninhalt}{622}$$

Zur Standardisierung der Werte wurde wiederum jeweils auf das Trockengewicht (oder 1oo mg Protein) der Zellen der Einzelprobe bezogen.

3. Messung der Glucose- und Pyruvat-Verwertung

Die Durchführung erfolgte nach HANSON et al. (1969).

Im Prinzip handelt es sich hierbei um die Messung der Radioaktivität (^{14}C)-markierter Produkte, die aus (^{14}C)-Glucose, (^{14}C)-Pyruvat und (^{14}C)-$NaHCO_3$ stammen. Die Radioaktivität wird mit Hilfe eines Scintillationsspectrometers (von der Fa. Packard, Modell 3375/3380) ermittelt. Der Berechnung der radioaktiven Mengen wurde 1 nCi = 2220 Zerfälle/Min. zugrundegelegt.

a) $^{14}CO_2$-Bildung aus (U-^{14}C)-Glucose

Wie üblich ATZ gewonnen und gewaschen und 3o Min. mit und ohne Aescinzusatz (3 x $1o^{-5}$M, Endkonzentration), inkubiert. Danach erfolgte einmaliges Waschen und Zentrifugieren. Die Zellen wurden mit Medium (II), 5 µmol Glucose/Ansatz und 1 µCi (U-^{14}C)-Glucose/Ansatz in 25 ml Erlenmeyerkolben im Schüttelwasserbad bei 37° C inkubiert. Das Gesamtvolumen betrug jeweils 5 ml. In die Erlenmeyerkolben waren Plastikeinsätze eingehängt und die Gefäße mit Gummikappen luftdicht verschlossen worden.

Nach O, 5, 1o, 2o und 4o Minuten wurden die Reaktionen entsprechender Ansätze durch Einspritzen von o,25 ml H_2SO_4 (10%ig) ins Medium und gleichzeitiger Gabe von o,4 ml Hyamin (Packard) in die eingehängten Plastikeinsätze unterbrochen. Zur quantitativen Austreibung des CO_2 und seine Bindung an Hyamin wurden die Gefäße weitere 6o Min. im Schüttelwasserbad belassen.

Danach wurden die Einsätze in vorbereitete Zählgläser mit 1o ml Scintillations-Toluol gegeben und die Radioaktivität ermittelt.

b) $^{14}CO_2$-Bildung aus (1- ^{14}C)-Pyruvat

Wie üblich wurden ATZ gewonnen und gewaschen und mit Medium (II), 5 µmol Glucose, 5 µmol $NaHCO_3$, 1 µCi (1- ^{14}C)-Pyruvat und teilweise mit 3 x $1o^{-5}$M Aescin (Endkonzentration) auf ein Gesamtvolumen von 5 ml gebracht. Die Ansätze wurden wie unter 3 a) beschrieben weiter behandelt und ausgewertet.

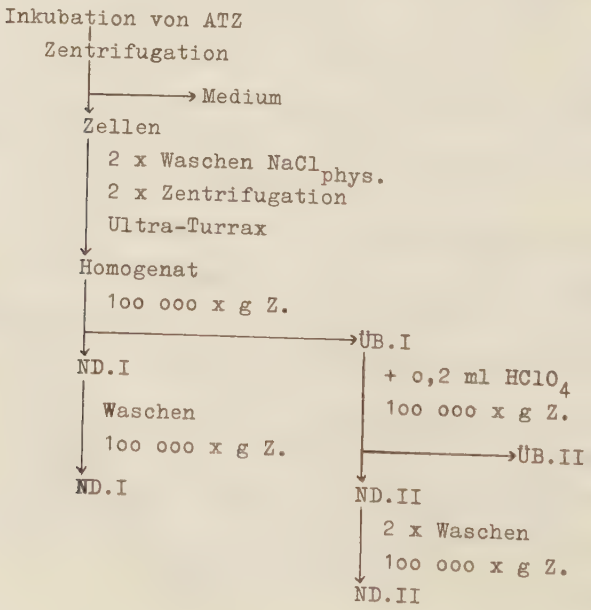
c) Pyruvat-Decarboxylierung im Homogenat

ATZ wurden wie üblich gewonnen und gewaschen. In einer ersten Inkubation wurden die Zellen mit Medium (II) 3o Min. teilweise mit Zugabe von Aescin (3 x $1o^{-5}$M, Endkonz.) im Schüttelwasserbad bei 37° C inkubiert. Ein Teil der Zellen wurde für eine zweite Inkubation verwendet und ein weiterer Teil der Zellen vor der zweiten Inkubation homogenisiert. Im zweiten Fall wurden die Zellen zentrifugiert und nach Verwerfen des Überstandes mit dem Ultra-Turrax unter standardisierten Bedingungen homogenisiert; dabei standen alle Gläser im Eis. Für die zweite Inkubation wurden Zellen und Homogenat mit Medium (II) unter Zusatz von o,5 ml Glucose (5 µmol), o,1 ml $NaHCO_3$ (5 µmol), o,4 ml (1- ^{14}C)-Pyruvat (1 µCi) und die Hälfte der Proben mit o,5 ml Aescin (3 x $1o^{-5}$M) (alle Konzentrationsangaben sind Endkonz.) auf ein Gesamtvolumen von 5 ml/Ansatz gebracht.

Die Inkubation erfolgte wie unter 3 a) beschrieben. Nach 0, 1o, 2o und 4o Min. wurden Reaktionen entsprechender Proben unterbrochen. Die Plastikeinsätze wurden mit ihrem Inhalt in Zählgläsern mit 1o ml Scintillations-Toluol zur Ermittlung der Radioaktivität gegeben.

d) $^{14}CO_2$-Fixation in Tumorzellen

Wie üblich wurden ATZ gewonnen und gewaschen und in Medium (II) 3o Min. im Schüttelwasserbad bei 37° C inkubiert. Das Gesamtvolumen betrug 5 ml und zugegeben wurden: 5 µmol Glucose, 5 µmol $NaHCO_3$, 5 µCi (^{14}C)-$NaHCO_3$ und teilweise 3 x $1o^{-5}$M Aescin (Endkonz.). Den weiteren Verlauf zeigt folgendes Schema, wobei ND. = Niederschlag und ÜB. = Überstand bedeuten:



Ergänzungen zum Verlaufsschema: Zur Ermittlung der Radioaktivität wurden jeweils die Niederschläge (ND.I = Organellen; ND.II = fällbare Proteine) nach Aufschwemmung mit Medium und von den Überständen jeweils o,2 ml (ÜB.I + II = Hyaloplasma) in Scintillationstoluol und zum Zählen gegeben. Die Trennung in Überstand und Niederschlag erfolgte mit der Spinco-Zentrifuge (Rotor Typ 4o, Festwinkelrotor). Die Überstände II wurden nach der Säurefällung vereinigt (je 6 Kontrollen und je 6 mit Aescin behandelte) und in ihrem Volumen eingeengt (Gefriertrocknung). Am nächsten Tag wurde mit 1o N KOH neutralisiert und auf je 1,5 ml aufgefüllt; davon wurden o,o5 ml zum Zählen abgenommen. Die Hauptmenge wurde auf eine mit Anionenaustauscher gefüllte Säule (Dowex 1 X 8, Höhe 12 cm, Durchmesser 1 cm) gegeben.

1. Passage: 15 ml aqua dest. = Filtrat

Je nach Wahl des Elutionsmittels ergaben sich drei Eluate: Eluat I = $\frac{N}{100}$ HCOOH (15 ml)

Eluat II = $\frac{N}{10}$ HCOOH (15 ml)

Eluat III = N-HCOOH (15 ml)

Nach der Säulenfraktionierung wurden die acht Fraktionen am Rotationsverdampfer bis zum Trocknen eingedampft, dann in o,5 ml aqua dest. aufgenommen und 5oμl zur Ermittlung der Radioaktivität in Scintillationstoluol in den Scintillator gegeben.

e) $^{14}CO_2$-Fixation in Lebermitochondrien

Es wurden die Lebern von zwei Ratten nach Dekapitation entnommen, gesäubert, zerkleinert und im Potter-Elvehjem in der Kälte homogenisiert. Als Homogenisationsmedium diente Saccharose-EDTA-Lösung (o,25 M Saccharose und 5 x $1o^{-4}$M EDTA). Zur Gewinnung der Mitochondrien wurde in der PHYWE "Eispirouette" (Rotor Typ 1) bei 3° C zentrifugiert, und zwar 1o Min. bei 3oo g. Dabei enthielt der Überstand die Mitochondrienfraktion und der Bodensatz die Kernfraktion. Der Überstand wurde weitere 1o Min. bei 12 ooo g zentrifugiert. Dabei fand sich im Sediment die Mitochondrienfraktion. Diese Fraktion wurde noch einmal gewaschen und zentrifugiert. Danach wurde sie mit folgenden Zusätzen: o,1 ml (^{14}C)-$NaHCO_3$ (2,5 μCi) und gegebenenfalls o,1 ml MICA (1,7 x $1o^{-6}$M) oder o,1 ml Aescin (1,5 bzw. 3 x $1o^{-5}$M, Endkonz.) und Medium (III) auf ein Gesamtvolumen von 3 ml/Ansatz gebracht. Die Ansätze wurden für 1o Min. im Schüttelwasserbad bei 37° C inkubiert und mit o,5 ml 2 M $HClO_4$ die Inkubation beendet. Zur quantitativen Austreibung des CO_2 verblieben die Ansätze eine weitere Stunde im Wasserbad. Nach Zentrifugation bei 3ooo U/min. in einer nicht gekühlten ECCO-Zentrifuge wurden o,2 ml des Überstandes zum Zählen in Zählgläser mit 8 ml Scintillationstoluol und 4 ml Alkohol gegeben.

4. Messung der Atmung

Die Atmung der ATZ wurde im "Warburg Apparat" nach Angaben von WARBURG (1923 u. 1924) und UMBREIT, BURRIS u. STAUFFER (1951) gemessen.

a) Versuchsanordnung

Zur Vorbereitung der Warburggefäße wurden o,2 ml 20%ige KOH in den zentralen kleinen Behälter gegeben. Außerdem wurden teilweise o,4 ml Aescinlösung (3 x $1o^{-5}$M, Endkonz.) und teilweise o,4 ml Medium oder aqua dest. in den Seitenarm des Gefäßes pipettiert.

Die ATZ wurden wie üblich gewonnen und gewaschen und mit Medium (II) und zum Teil mit o,2 ml Glukoselösung (1oμmol/Ansatz) in die vorbereiteten Warburggefäße gegeben. Das Gesamtvolumen betrug jeweils 2,2 ml. Ein Warburggefäß enthielt anstelle der Zellsuspension nur Medium und diente zur Anzeige der Temperaturkonstanz.

Die Zellen wurden nach dem Einhängen der Gefäße in den Warburgapparat für 1o Min. mit reinem O_2 durchströmt. Die Temperatur betrug 37^{o} C; die Schüttelfrequenz 60/min. und die Amplitude 4 cm. Nach einer Äquilibrationszeit von 1o-15 Minuten und einer Einstellung von Temperatur und Druck begann die eigentliche Meßperiode. Nach einer bestimmten Zeit wurden die Seitenarme in die Gefäße entleert. Die Druckveränderungen im Manometer wurden noch mindestens eine Stunde verfolgt.

b) Berechnung

Die Berechnung erfolgte nach op.cit.p.2 (1951)

$$K_{O_2} = V_g \frac{\frac{273}{T} + V_f \alpha}{P_o}$$

Unter Berücksichtigung der Gefäßkonstante erfolgt die Berechnung des Sauerstoffverbrauchs:

$$h \times K_{O_2} = \mu l\ O_2\text{-Verbrauch}$$

Zur Standardisierung wurden die erhaltenen Werte des O_2-Verbrauchs pro Stunde und mg Trockengewicht pro Ansatz bezogen.

Symbole:

V_g = Volumen der Gasphase im Gefäß, einschließlich der Verbindungsdrähte und des Manometers bis zum Nullpunkt.

T = Temperatur des Wasserbades in absoluten Werten (273 + ..°C)

V_f = Volumen der gesamten Flüssigkeit im Gefäß

α = Löslichkeitskonstante, die sich aus verwendetem Lösungsmittel und Gas bei 37°C zusammensetzt (= o,o24o)

P_o = 76o mmHg (Standarddruck), umgerechnet für die Manometerflüssigkeit; Manometer enthielt "Brodies-Lösung"

$$P_o = 76o \times \frac{13,6o}{1,033} = 1o\,ooo$$

h = Druckveränderungen im Manometer in mm

5. Trockengewichts- und Proteinbestimmung

a) Trockengewichtsbestimmung

Bei allen durchgeführten Versuchen wurde zweimal 1 ml Zellsuspension in zwei vorgewogene Zentrifugengläser (Analysenwaage) pipettiert. Die erste Abnahme erfolgte zu Beginn der Aufteilung der Zellsuspension, die andere am Ende. die Zellen wurden 5 - 1o Min. zentrifugiert (3ooo U/min.) und nach Dekantieren des Überstandes für 1 - 2 Tage zum Trocknen in den Trockenschrank gestellt (bis zur Gewichtskonstanz). Durch erneutes Wägen auf der Analysenwaage ergibt die Differenz der Gewichte das Trockengewicht der Zellen. Der Mittelwert der Gewichte der beiden Proben wird den Berechnungen zugrundegelegt.

b) Proteinbestimmung

Die gewogenen Zellproben wurden in einem Exsiccator gesammelt und durch die Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl das Protein ermittelt.

6. Messung des Tumorwachstums

a) nach Inokulation mit Aescin vorbehandelter ATZ

b) nach Aescininjektionen an tumortragende Mäuse

a) Eine einheitliche Suspension von ATZ wurde wie üblich gewonnen. Nach unterschiedlicher Vorbehandlung wurden jeweils gleiche Mengen reokuliert. Vorbehandlung:

Ko.: Inkubation bei 37°C im Wasserbad mit Medium I
A_1: " " " zusätzlich: 3 x 10^{-5}M Aescin (Endkonz.)
A_2: " " " zusätzlich: 10^{-4}M Aescin (Endkonz.)

Nach der Inkubation wurden die Zellen zentrifugiert und mit physiol.NaCl-Lösung aufgefüllt. Inokulation erfolgte wie üblich. Nach 7 Tagen wurden die Mäuse dekapitiert, der Ascites entnommen, der Bauchraum mit 1 ml physiol.NaCl nachgespült. In vorgewogenen Zentrifugengläsern wurden die erhaltenen Zellen gewaschen (aqua dest.), getrocknet und das Trockengewicht bestimmt.

b) Drei Gruppen von je 15 Mäusen wurden 24 Stunden nach üblicher Inokulation von ATZ folgende Injektionen s.c. (Rückenhaut) gegeben:

Ko.: 0,01 ml NaCl phys./g Körpergewicht
A_1: 0,01 ml einer 0,75 mg/3,75 ml Aescinlösung
= 2 mg/kg Körpergewicht
A_2: 0,01 ml einer 1,875 mg/3,75 ml Aescinlösung
= 5 mg/kg Körpergewicht

Die Injektionen wurden 24stündlich insgesamt 6 mal vorgenommen. Dabei wurde das Gewicht der Mäuse notiert. Am 7. Tag nach Inokulation wurden die Mäuse dekapitiert und der Ascites aus dem Bauchraum entnommen und wie unter a) das Trockengewicht der Zellen bestimmt.

7. Statistische Auswertung

Die Versuchsanordnungen erlaubten eine Prüfung der Ergebnisse im zweiseitigen Signifikanztest nach Student (t-Test). Die Wahrscheinlichkeit, daß die Differenz der Mittelwerte (m_1 und m_2) Null ergibt (Nullhypothese) beträgt 99,73 %. Der t-Wert der Meßreihen wurde nach der Formel

$$t = \frac{m_1 - m_2}{\sqrt{\varepsilon_1^2 + \varepsilon_2^2}}$$

errechnet.

Dabei bedeuten für jede Meßreihe:

$\varepsilon = \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$ Standardfehler

σ = Streuung

n = Anzahl der Messungen je Stichprobe

Die zu t gehörige Wahrscheinlichkeit für das Zutreffen der Nullhypothese wurde unter dem Freiheitsgrad = $n_1 + n_2 - 2$, also für je 4 Meßwerte: 4 + 4 - 2 = 6 der Signifikanzschrankentabelle nach Student (Documenta Geigy) entnommen.

In dieser Arbeit werden Differenzen der Mittelwerte zweier Versuchsreihen als statistisch signifikant betrachtet, wenn $p \leq 0{,}0027$ ist; $p \leq 0{,}05$ gilt als statistischer Unterschied.

C. ERGEBNISSE

1. Glukoseaufnahme in Ascitestumorzellen unter Aescin

Wird zu einer glukosehaltigen ATZ-Suspension Aescin hinzugefügt, so beträgt die Glukoseabnahme im Außenmedium über eine Stunde bei Anwesenheit von $1o^{-4}M$ Aescin ca. 6 % des Kontrollwertes (Abb.1). Zugleich zeigt die Abbildung, daß zwei Hemmstoffe des Glukosetransports am Fettgewebe (Triamteren und Amilorid) keine Wirkung auf den Glukosetransport der ATZ haben. Der zeitliche Verlauf der Glukosewerte im Außenmedium zeigt außerdem, daß die Hemmung der Glukoseaufnahme in die ATZ durch Aescin sofort einsetzt und nicht erst nach längerer Latenzzeit (Abb.2).

Wird der gleiche Versuch mit verschiedenen Konzentrationen von Aescin ($3 \times 1o^{-5}M$, $1o^{-5}M$ und $1o^{-4}M$) wiederholt, so ergibt sich, daß die gerade noch wirksame Konzentration für die Hemmung der Glukoseaufnahme zwischen $1o^{-5}M$ und $3 \times 1o^{-5}M$ Aescin (Endkonz.) liegt (Abb.3).

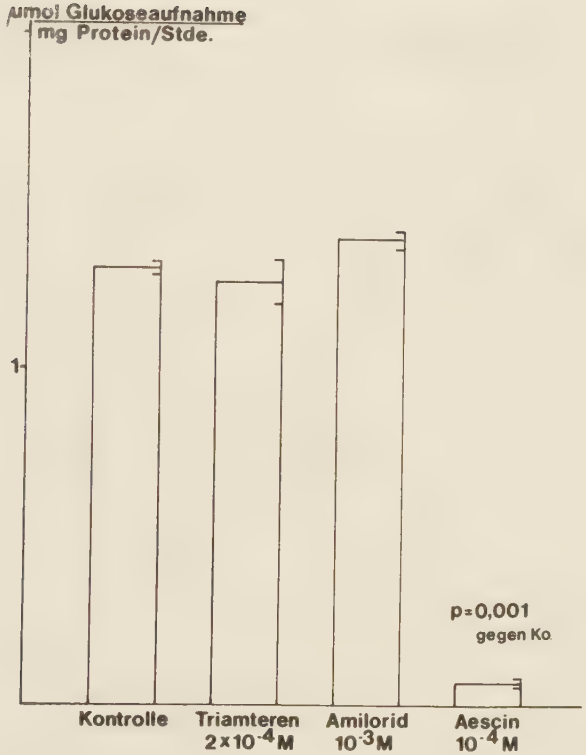


Abb.1: Glukoseaufnahme von Yoshida-Ascites-Tumorzellen bei Zugabe verschiedener Substanzen (Angabe in Endkonzentrat.)
Medium: Krebs-Ringer-Lösung, pH 7,2
Zusätze: 15 µmol Glukose/Ansatz
Gesamtvolumen: 5 ml
gilt für Abb. 1-3

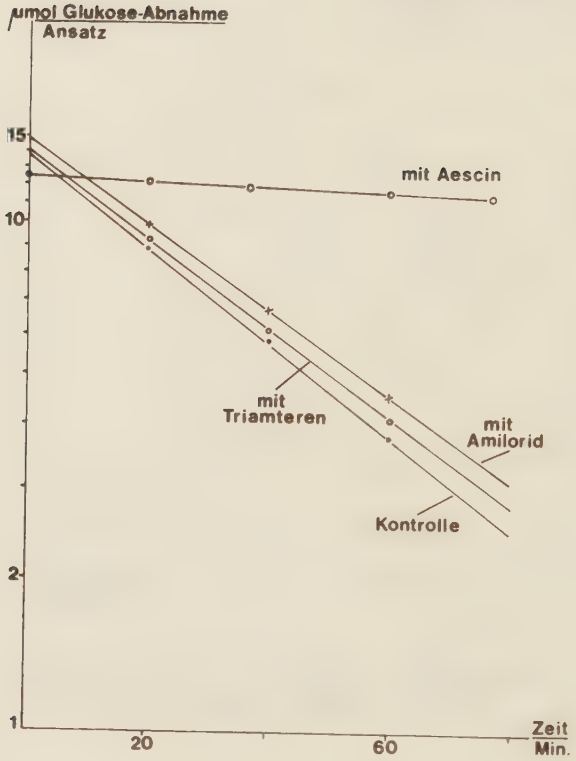


Abb.2: Halblogarithmische Darstellung der Zeitkurve der Glukoseabnahme im Medium inkubierter Yoshida-Ascites-Tumorzellen bei Zugabe verschiedener Substanzen
Konzentrationen wie bei Abb.1

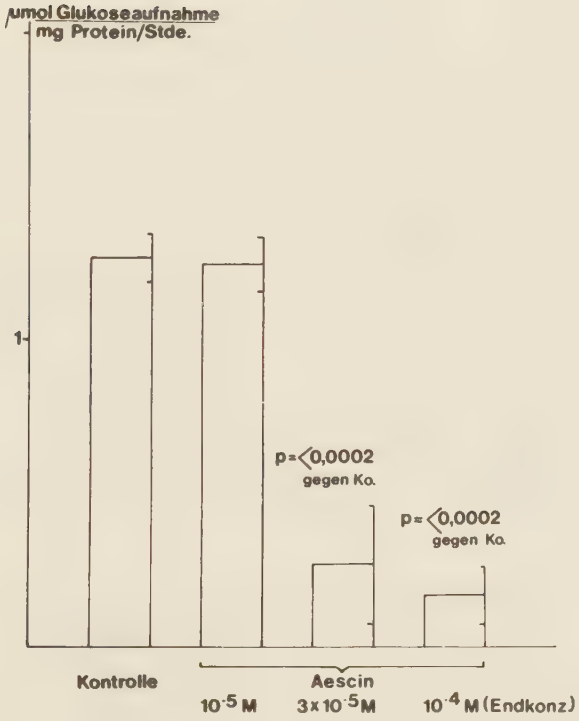


Abb.3: Glukoseaufnahme von Ascites-Tumorzellen mit Aescinzugabe unterschiedlicher Konzentrationen

2. Aescinwirkung auf die Glykolyse

Zur Vermeidung von Membraneffekten wird als Maß der Glykolyse die Laktatbildung im zellfreien Homogenat gemessen.

Die Abb. 4 zeigt, daß die so gemessenen Laktatwerte unter Aescinvorbehandlung der ATZ mit Glukose um 92 % niedriger lagen als die Kontrollen (Säule I u. II). Wird dem Homogenat nur in der zweiten Inkubation Aescin zugesetzt (Säule III), so liegen diese Laktatgehalte zwischen denen der Kontrollgruppe und den vorher mit Aescin behandelten ATZ (Säule I u. II). Die Laktatgehalte der in der ersten Inkubation mit Aescin behandelten Zellen unterscheiden sich nicht von den Laktatgehalten der in der ersten und zweiten Inkubation mit Aescin behandelten ATZ (Säule II u. IV).

In einem folgenden Versuch wurde eine Bilanz der Laktatwerte der intakten Zellen, des daraus gewonnenen Homogenats und der dazugehörigen Überstände aufgestellt (Abb. 5). Danach ergibt sich ein signifikanter Unterschied der mit Aescin behandelten ATZ gegenüber den Kontrollen. Die Hemmung der Glykolyse durch 3×10^{-5} M Aescin ist sowohl bei Zusatz von Glukose als auch ohne Glukose signifikant (Tab.1). Die Verarmung der Zellen an Laktat kommt also nicht nur durch einen stärkeren Laktatausstrom aus den Zellen zustande.

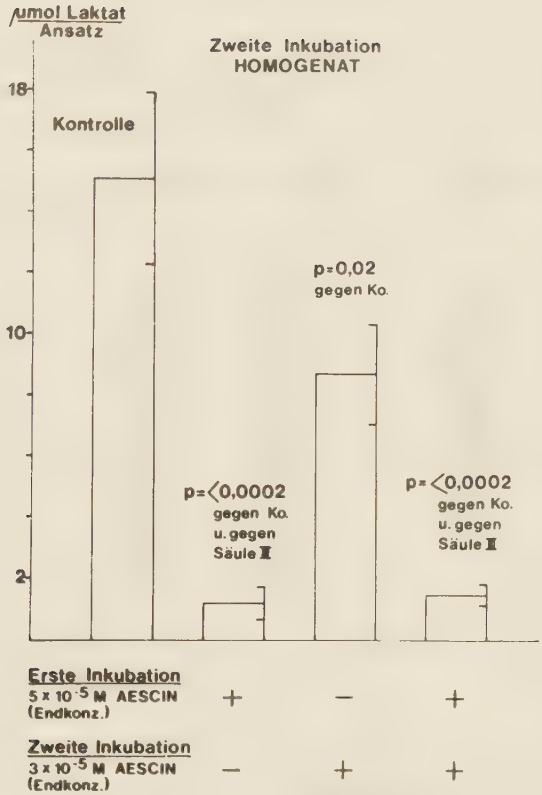


Abb.4: Laktatbestimmung im Homogenat nach Aescinzugabe teilweise zu intakten Zellen (erste Inkubation) und teilweise zum Homogenat (zweite Inkub.)
\+ = Aescinzugabe
\- = keine Aescinzugabe
Medium: Krebs-Ringer-Lösung, pH 7,2
Zweite Inkubat. zusätzl.: 1o µmol Glukose/Ansatz; 5 x 1o^{-4}M NADP/Ansatz; 2,5 x 1o^{-3}M ATP/Ansatz
Inkubationsdauer: 3o Min.

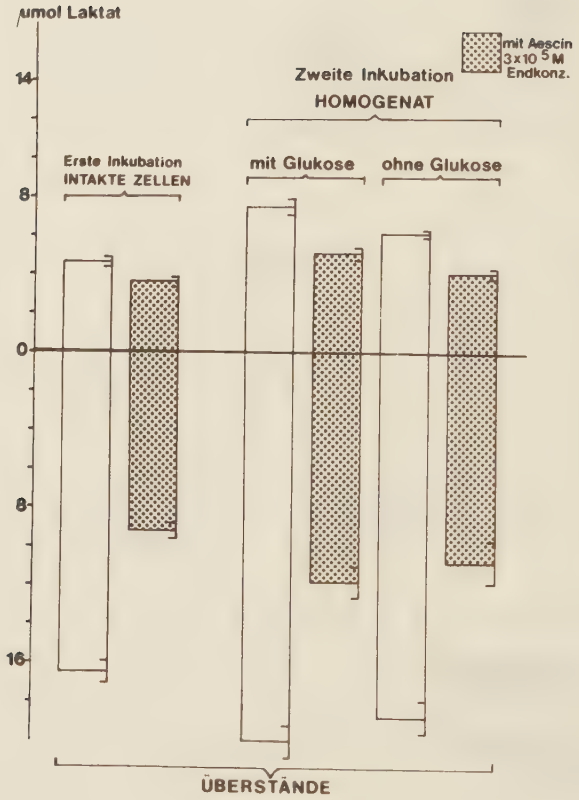


Abb.5: Aescinwirkung auf Laktat aus intakten Zellen, Homogenaten und Überständen

Alle Laktatmengen beziehen sich auf das Protein der Zellen der ersten Inkubation (zur Verdeutlichung wurde auf 1oo mg Protein umgerechnet)

Tab. 1

Statistische Auswertung

	µmol Laktat/ 100 mg Prot./30 min.	t	p	Signifikanz
Erste Inkubation Intakte Zellen				
M_1^*: Ko.	4.64	6.37	0,001	S
M_2: Aescin	3.64			
Zweite Inkubation Homogenat				
M_1: Ko. + Glukose	7.49	8.12	0,0002	S
M_2: Aescin + Gluk.	6.11			
M_3: Ko. - Glukose	5.08	15.04	0,0002	S
M_4: Aescin - Gluk.	4.05			

M^*: Mittelwert von 4 Ergebnissen; die Zahlen bedeuten nur fortlaufende Numerierung

Die Laktatkonzentrationen im Überstand entsprechen nach der ersten Inkubation den Laktatgehalten der ATZ. Wird wie in der Kontrolle mehr Laktat gebildet als unter Aescinzusatz, so tritt eine größere Menge aus der Zelle ins Medium über und wird im Überstand gemessen. WU u. RACKER (1958) stellten fest, daß alle Enzyme der Glykolyse auch im Überstand zu finden sind, so daß eine Laktatbildung extrazellulär möglich ist.

Eine rechnerische Überlegung zeigt ein konstantes Verhältnis von Kontrollen zu Aescinbehandlung in Zellen, Homogenaten und Überständen (Tab.2).

Tab.2

	µmol Laktat/ 100 mg Prot./30 min.	Verhältnis-zahl
Erste Inkubation		
Ko.(Homogenat + Überst.)	21.11	
Aescin (" + ")	12.82	1.65
Zweite Inkubation		
Ko.+ Gluk.(Homog.+ Üb.)	27.45	
Aescin " (" + ")	16.86	1.63
Ko.- Gluk.(Homog.+ Üb.)	24.82	
Aescin " (" + ")	14.82	1.67

Diese Konstanz bedeutet, daß die Einwirkung von Aescin auf die Laktatmengen durch das Auflösen des Zellverbandes nicht beeinflußt werden.

Auch in allen weiteren Versuchen an Homogenaten ergab Aescin einen signifikant geringeren Laktatgehalt gegenüber den Kontrollen (Tab.3).

Tab.3

Tumorzellart	Alter der Zellen	mit Glukose	Aescinkonzentration	Verminderung in %	t	p
Yoshida	8 Tge.	+	5×10^{-5} M	92	8.07	<0,0002
Yoshida	6 "	+	3×10^{-5} M	51	4.40	~0,0027
Yoshida	8 "	+	3×10^{-5} M	67	6.45	<0,001
Yoshida	7 "	+	3×10^{-5} M	76	11.21	<0,0002

Dafür gibt es zwei Möglichkeiten der Erklärung:

1. Laktat wird unter der Einwirkung von Aescin vermindert gebildet oder
2. Laktat wird unter Aescin vermehrt abgebaut

Im ersten Fall müßte der Hemmeffekt des Aescins in der Glykolyse vermutet werden. Daher wurde untersucht, ob bei Zugabe einiger in der Glykolyse gebildeter Substrate zum Homogenat die Einwirkung von Aescin innerhalb der Glykolyse lokalisiert werden kann. Wird G6P, FDP oder PEP in stöchiometrisch gleicher Menge dem Homogenat zugesetzt, so liegen sowohl die Kontrollwerte als auch die mit Aescin zwischen 2,7 und 2,44 µmol Laktat/1oo mg Protein/3o Min. Die erniedrigten Kontrollwerte ohne Glukosezusatz und mit anderen Substraten wurden auch von TIEDEMANN u. BORN (1960) gefunden. Nur zeigen in meinem Versuch Kontrollen und Aescin keinen Unterschied mehr. Die mit Glukosezusatz erzielten Laktatwerte betrugen 6,78 µmol Laktat/1oo mg Protein/3o Min., wobei Aescin diesen Wert auf 2,23 µmol Laktat/1oo mg Prot./3o Min. senkte. Aescinzugabe hemmt die Laktatbildung also nur mit Glukosezusatz zum Homogenat, wenn man von Bedingungen ohne jeglichen Substratzusatz absieht.

Daher wurde in einem weiteren Versuch zur zweiten Inkubation entsprechend vorbehandelter Zellen Hexokinase hinzugefügt und Glukose als Substrat verwendet. Auch bei diesem Versuch blieb der Hemmeffekt durch Aescin bei 47 %; also in der Größenordnung des Vergleichansatzes ohne Hexokinase (Hemmeffekt 51 %).

Andererseits kann Aescin ein Austreten von aktiver Hexokinase aus der Zelle nicht bewirkt haben, denn in Überständen nach der ersten Inkubation findet sich Hexokinase in etwa gleicher Aktivität (Ko.: 8,36 µmol NADP/min./Ansatz; Aescin: 9,32 µmol NADP/min./Ansatz). Es zeigt sich sogar, daß im Homogenat die Aktivität dieses Enzyms nach Vorbehandlung mit Aescin geringfügig höher liegt.

Auch das Austreten eines thermolabilen Faktors erscheint unwahrscheinlich. Wird nämlich ein Teil des dem Homogenat wieder zugesetzten Überstandes auf 100°C für 7 Min. erhitzt, so ergeben sich keine unterschiedlichen Laktatmengen zu den nicht erhitzten Ansätzen.

Das für die Hexokinase-Reaktion notwendige ATP, das jeweils zum Homogenat in 2,5 x 10^{-3}M Konzentration zugesetzt wurde, wurde im Verlauf der Inkubation zu etwa der Hälfte verbraucht (Tab.4). Außerdem deutet sich ein geringfügiges Austreten von ATP aus der Zelle unter Aescin an.

Zugegebene Menge ATP/Ansatz: 8,79 mg

Tab.4

Bedingungen		Verbrauch	
Glukose	Aescin	ATP mg/Ansatz	ATP mg/100 mg Prot./30 Min.
-	-	3.71	10.00
+	-	4.62	12.45
-	+	4.79	12.91
+	+	5.62	15.15

Durch Zusatz des Überstandes zum Homogenat wird dieser Effekt ausgeglichen (Tab.5).

Tab. 5

Bedingungen		Verbrauch	
Glukose	Aescin	ATP mg/Ansatz	ATP mg/1oo mg Prot./3o Min.
-	-	3.90	10.50
+	-	5.23	14.10
-	+	3.84	10.35
+	+	5.67	15.30

Wie erwähnt könnte die unter Aescinvorbehandlung deutlich geringere Laktatmenge in Tumorzellen auch von einer erhöhten Laktatverwertung unter Aescin herrühren. Ein Weg führt dabei sowohl zur Essigsäure als auch dem Acetyl-CoA, die beide wiederum in einem enzymatischen Gleichgewicht stehen (WIELAND, 1966). Bei den Schritten von Laktat zu Acetyl-CoA wird CO_2 abgegeben und auch im weiteren Verlauf im Zitronensäurezyklus spielt CO_2 eine Rolle. Deshalb wurde die folgende Laktatmessung in bikarbonatfreiem Medium vorgenommen, wobei das Medium einer Sauerstoff- oder Stickstoff-Atmosphäre ausgesetzt wurde. Hierbei zeigte sich, daß die bisher deutliche Verminderung des Laktatgehaltes unter Aescin aufgehoben wurde (Abb.6).

Dieses Ergebnis scheint auf einen Zusammenhang zwischen der Wirkung von Aescin und CO_2-Bildung oder CO_2-Fixation hinzuweisen.

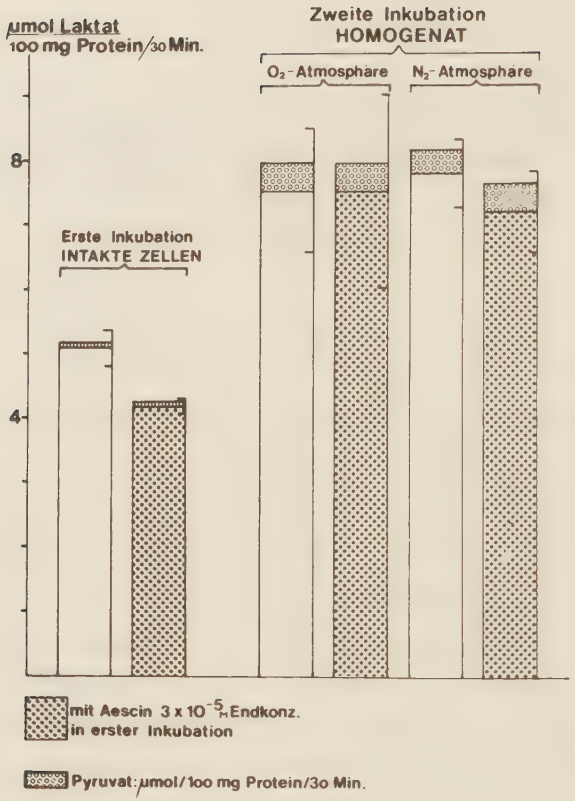


Abb.6: Aescinwirkung auf Laktat und Pyruvat unter O_2- und N_2-Atmosphäre des Mediums für die zweite Inkubation
Medium: Krebs-Phosphat-Puffer, pH 7,0
Zusätze: 5 x 10^{-4}M NADP/Ansatz
2,5 x 10^{-3}M ATP/Ansatz

3. Glukose- und Pyruvatverwertung unter Aescin

a) $^{14}CO_2$-Bildung aus (U-^{14}C)-Glukose

Abb.7 zeigt, daß die $^{14}CO_2$-Bildung aus (U-^{14}C)-Glukose nach Aescinvorbehandlung von Beginn an stark abgeschwächt abläuft. Die folgenden Zahlen sollen eine Abschätzung der Differenz zwischen Glukoseaufnahme (Abb.3) und CO_2-Bildung ermöglichen.

Die Hemmung der $^{14}CO_2$-Bildung ist sehr ausgeprägt und es ergibt sich zum

Zeitpunkt	0	Min.	eine Hemmung	von	66 %
"	5	"	"	"	80 %
"	10	"	"	"	80 %
"	20	"	"	"	88 %
"	40	"	"	"	93 %

b) $^{14}CO_2$-Bildung aus (1-^{14}C)-Pyruvat

In einer Inkubation von ATZ unter Zugabe von (1-^{14}C)-Pyruvat wurde das abgegebene $^{14}CO_2$ bestimmt. Abb.8 zeigt, daß im Gegensatz zur linearen $^{14}CO_2$-Bildung bis zur 120 Minute bei den Kontrollansätzen, der Zusatz von Aescin eine weitere Zunahme nach der 15. Minute verhindert. Hingegen läßt Abb. 9 erkennen, daß die Hemmung der $^{14}CO_2$-Bildung durch Aescin im Homogenat nicht mehr auftritt. Es lassen sich sogar nach 10 und 20 Minuten höhere Werte des $^{14}CO_2$ in den Aescinansätzen gegenüber den Kontrollen finden.

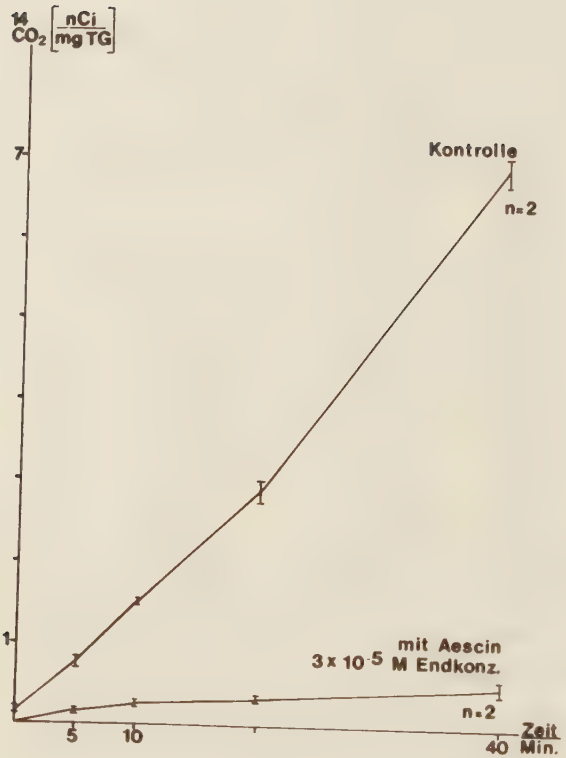


Abb.7: Vergleich der Wirkung von Aescin auf die $^{14}CO_2$-Bildung aus (U-^{14}C)-Glukose inkubierter Ascites-Tumorzellen mit einer Kontrollgruppe
Medium: Krebs-Phosphat-Puffer, pH 7,2
Zusätze: 5 µmol Glukose/Ansatz
1 µCi (U-^{14}C)-Glukose/Ansatz

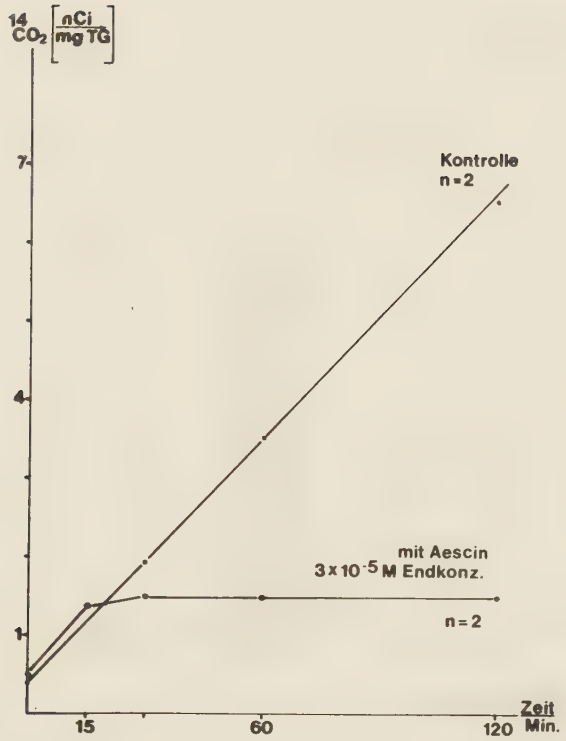


Abb.8: Vergleich der Aescinwirkung auf die $^{14}CO_2$-Bildung aus (1-^{14}C)-Pyruvat in Ascites-Tumorzellen und einer Kontrollgruppe zu unterschiedlichen Zeiten
Medium: Krebs-Phosphat-Puffer, pH 7,4
Zusätze: 5 µmol Glukose/Ansatz
5 µmol $NaHCO_3$/Ansatz
1 µCi (1-^{14}C)-Pyruvat

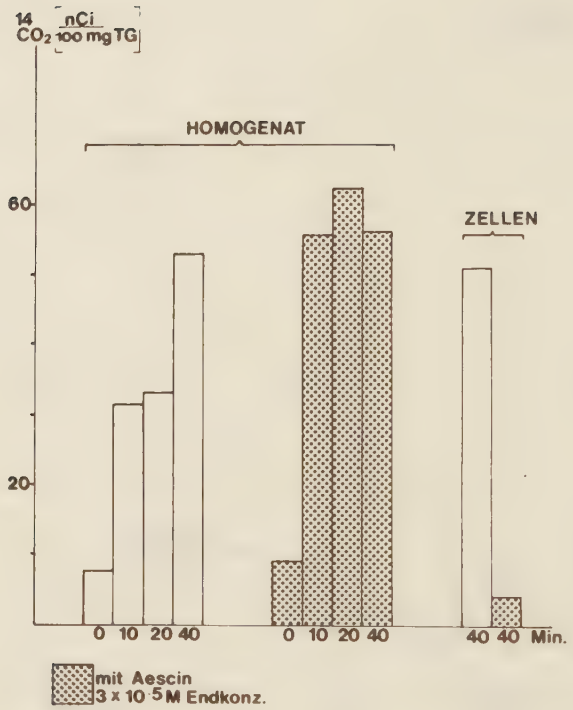


Abb.9: Aescinwirkung auf die Pyruvatdecarboxylierung im Homogenat und intakten Zellen. Aescinzugabe in erster und zweiter Inkubation
Medium: Krebs-Phosphat-Puffer, pH 7,4
Zusätze: 5 µmol Glukose/Ansatz
5 µmol $NaHCO_3$/Ansatz
1 µCi (1-^{14}C)-Pyruvat/Ansatz

c) $^{14}CO_2$-Fixation in Ascites-Tumorzellen

Das in den Mitochondrien fixierte CO_2 tritt in Oxalacetat und seinen sauren Folgeprodukten wie z.B. Citrat und Malat auf. Wird radioaktives Bikarbonat (5 µCi/Ansatz) angeboten, so sollte die Hauptmenge der Fixationsprodukte im Hyaloplasma gefunden werden. Wie Abb. 10 zeigt, findet sich tatsächlich die überwiegende Menge der Radioaktivität im Überstand I. Nach 120 Minuten waren es - ausgedrückt in der gefundenen Radioaktivität - 49 µCi/1oo mg TG*, während die fällbaren Proteine mit 1,8 µCi/1oo mg TG und die Organellen mit 4 µCi/1oo mg TG nur unbedeutend markiert waren.

Unter Aescinvorbehandlung erreichen die Fixationsprodukte im Hyaloplasma mit 3,8 µCi/1oo mg TG nur 1/13 der Kontrollwerte; in den fällbaren Proteinen betragen sie 1/10 (o,18 µCi/1oo mg TG), während sie in den Organellen nur 1/20 (o,2o µCi/1oo mg TG) ausmachen.

Zur weiteren Charakterisierung der Fixationsprodukte wurde nach Säureausfällung der Proteine aus dem Hyaloplasma mit einem Anionenaustauscher fraktioniert. Dabei ergab sich, daß bei den Kontrollen 65,3 % der radioaktiven Produkte von dem Austauscher festgehalten und erst mit 1 N-Ameisensäure eluiert wurden, während der entsprechende Wert unter Aescinzusatz bei 26,8 % liegt.

* Trockengewicht

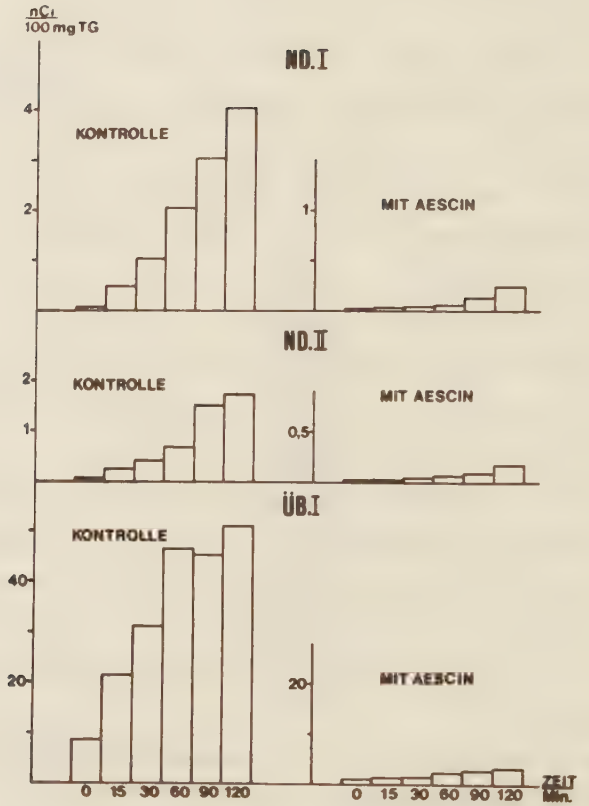


Abb.10: Aescinwirkung auf den (^{14}C)-Einbau in Ascites-Tumorzellen nach Inkubation mit (^{14}C)-$NaHCO_3$
Medium: Krebs-Phosphat-Puffer, pH 7,4
Zusätze: 5 µmol Glukose/Ansatz
5 µmol $NaHCO_3$/Ansatz
5 µCi (^{14}C)-$NaHCO_3$/Ansatz
ND.I (Niederschlag): Organellen
ND.II: fällbare Proteine
ÜB.I (Überstand): Hyaloplasma

Die weitere Radioaktivität verteilt sich wie folgt:

Tab. 6

durch Elution mit Ameisensre. N/10		N/100		mit aqua dest. herauslösbar	
Ko.	Aesc.	Ko.	Aesc.	Ko.	Aesc.
15.5 %	17.7 %	6.7 %	34 %	12.9 %	21.5 %

d) $^{14}CO_2$-Fixation in Lebermitochondrien

In diesem Versuch wird das markierte Bikarbonat unter Umgehung der Zellmembran direkt den Mitochondrien angeboten. Abb. 11 zeigt, daß weder eine Konzentration von $1{,}5 \times 10^{-5}$M Aescin noch 3×10^{-5}M einen signifikanten Unterschied zur Kontrolle aufweisen. MICA (5-Methoxyindol-2-carbonsäure) hingegen hemmt die $^{14}CO_2$-Fixation in der von BAUMANN u. HILL (1968) beschriebenen Weise.

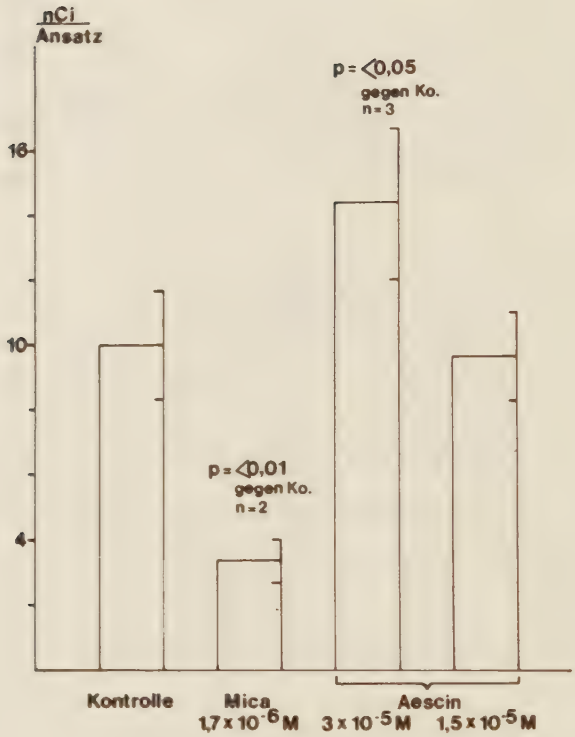


Abb.11: Aescin- und MICA-Wirkung auf die $^{14}CO_2$-Fixation aus (^{14}C)-$NaHCO_3$ in Lebermitochondrien (Ratten)
Medium: Triäthanolamin-Phosphat-Puffer, pH 7,2
Inkubationsdauer: 10 Min.

4. Atmung der Ascites-Tumorzellen unter Aescin

Die Atmung ist eine Funktion der Mitochondrien. Aescinzusatz von 3 x 10^{-5}M zu atmenden ATZ, die kein Substrat im Medium enthalten, zeigt nach 20 Min. eine fast vollständige Hemmung der Atmung (Siehe Abb.12). Der Kontrollwert von 7,21 μl O_2-Aufnahme/mg TG/Stde. stimmt mit Werten aus der Literatur überein (WARBURG, 1956; BENADE, HOWARD, BURK, 1969).

Durch Zusatz von Glukose kann keine Änderung des Hemmeffektes hervorgerufen werden; dagegen stellt sich die erwartete verminderte Atmung bei Glukosezugabe ein (CRABTREE, 1929), (Abb.13).

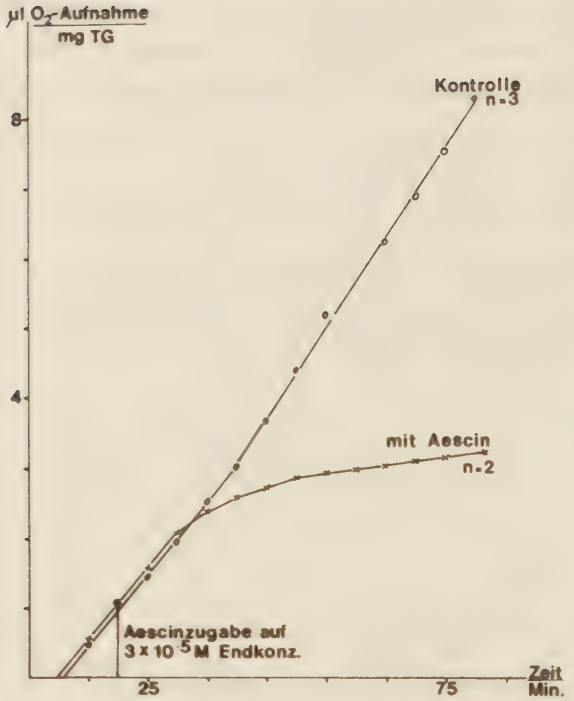


Abb.12: Wirkung des Aescins auf den O_2-Verbrauch von Yoshida-Ascites-Tumorzellen im Vergleich zu einer Kontrollgruppe
Der Endwert der mit Aescin behandelten Zellen ist auf dem o,o2 % Niveau signifikant gegenüber den Kontrollen
Medium: Krebs-Phosphat-Puffer, pH 7,4
Gesamtvol.: 2,2ml - Messung im Warburg-Apparat

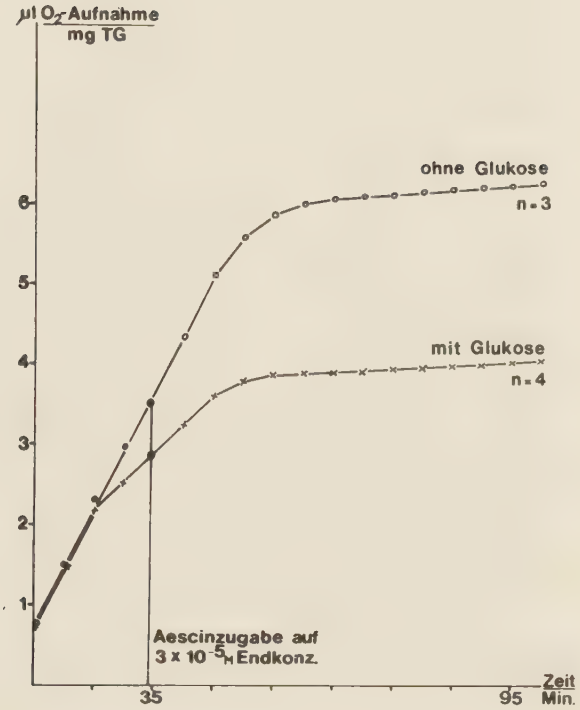


Abb.13: Wirkung des Aescins auf den O_2-Verbrauch von Yoshida-Ascites-Tumorzellen mit und ohne Glukosezugabe
Medium: Krebs-Phosphat-Puffer, pH 7,4
Zusätze: 1o µmol Glukose
Gesamtvol.: 2,2 ml - Messung im Warburg-Apparat

5. Elektronenoptische Aufnahmen einer Ascites-Tumorzelle nach Aescinbehandlung

Im Anschluß an den offensichtlichen Hemmeffekt der Atmung durch Aescin wurde zu Zeitpunkten vor und nach seinem Auftreten, d.h. nach 7,5 resp. 3o Min. Inkubationsdauer mit 3 x 10^{-5}M Aescin eine morphologische Kontrolle der Zellen, speziell der Mitochondrien, vorgenommen.

Dabei ergab sich bei elektronenoptischen Bildern mit einer Vergrößerung von 28 ooo; 1μ = 2,8 cm, die im Anatom. Institut der FU* angefertigt wurden, folgendes: (Abb.14 - 17).

Im Vergleich zu den Kontrollbildern finden sich unter Aescin: bei den Mitochondrien nur Veränderungen innerhalb der Variationsbreite, nicht aber solche, die pathognomisch für den Verlust der Funktion sind. Mitochondrien unter O_2-Mangel ergeben ein anderes elektronenoptisches Bild.

Außerdem sind am Kern vermehrt dunkle Stellen als Randchromatin zu erkennen. Die unit membrane ist besonders an Stellen, an denen Mikrovilli gehäuft auftreten, nicht nachweisbar. Nach Inkubation mit Aescin fehlen die Mikrovilli. Nach 7,5 Min. Aescinbehandlung sind die Zellen am stärksten geschwollen; das drückt sich in der größeren Helligkeit aus.

* Hier sei bes. Dank Herrn Prof.Dr.Merker für seine Hilfe und Beratung ausgesprochen

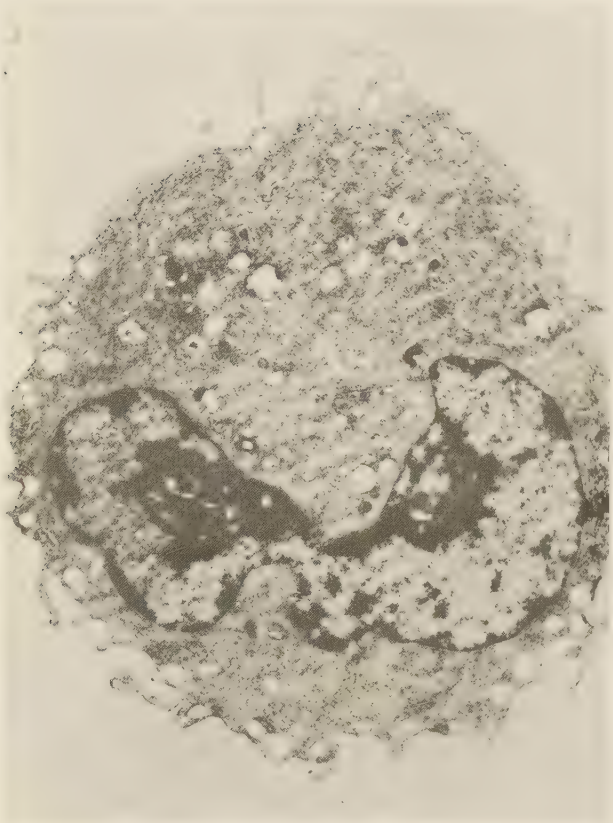


Abb.14: Elektronenoptische Aufnahme
Normale Yoshida Ascites-Tumorzelle
(Alter: 7 Tage)
Vergrößerung: 2o ooo - 1μ = 2,o cm

Abb.15: Yoshida Ascites-Tumorzelle nach 3o Min. Inkubation im Schüttel-wasserbad bei 37° C
Medium: Krebs-Ringer-Lsg., pH 7,2
Vergrößerung: 28 ooo - 1 μ = 2,8 cm

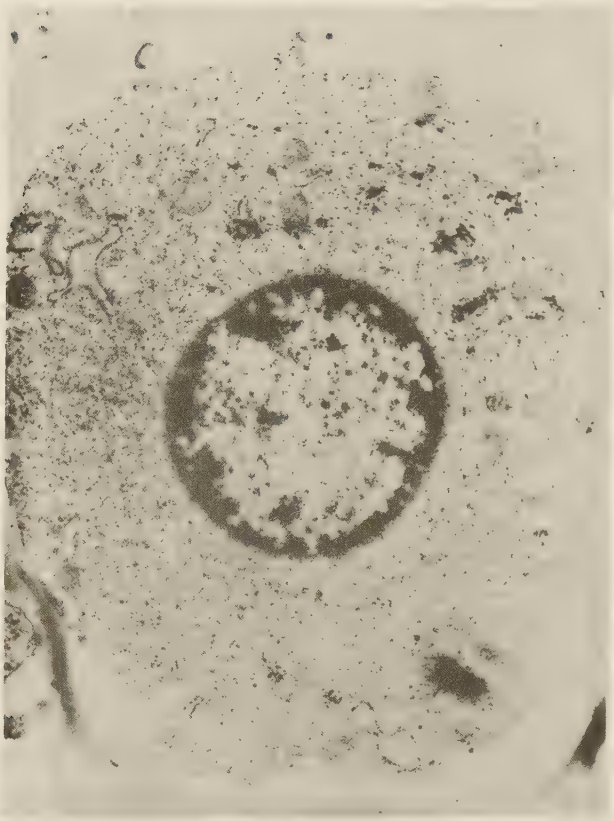


Abb.16: Yoshida Ascites-Tumorzelle nach 7,5 Min. Inkubation im Schüttelwasserbad bei 37°C
Medium: Krebs-Ringer-Lsg., pH 7,2
Zusatz: 3 x 10^{-5}M Aescin (Endkonz.)
Vergrößerung: 28 000 - 1μ = 2,8 cm

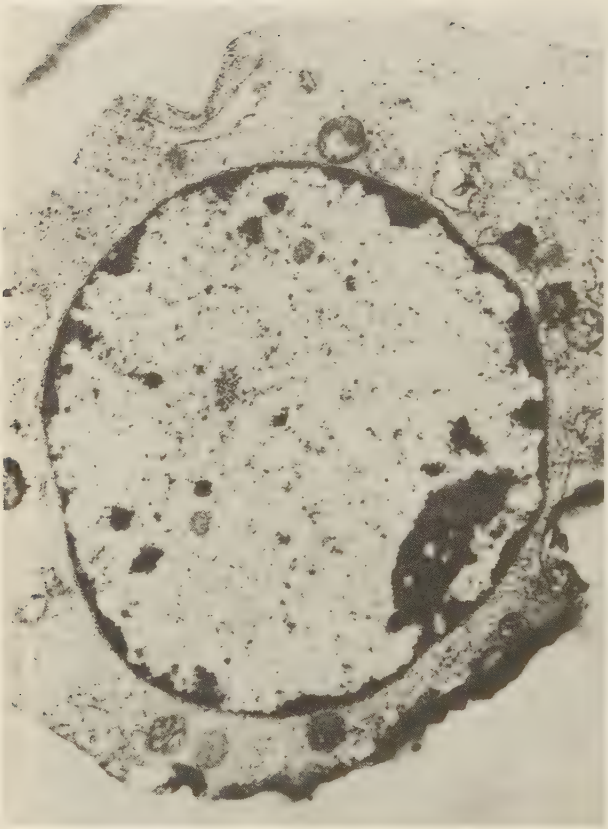


Abb.17: Yoshida Ascites-Tumorzelle nach 3o Min. Inkubation im Schüttelwasserbad bei 37° C
Medium: Krebs-Ringer-Lsg., pH 7,2
Zusatz: 3 x $1o^{-5}$M Aescin (Endkonz.)
Vergrößerung: 28 ooo - 1μ = 2,8 cm

6. Auswirkungen von Aescin auf das Tumorwachstum

Werden die Ascites-Tumorzellen vor ihrer Inokulation mit 3 x 10^{-5}M Aescin vorbehandelt, so ergeben sich in der nach 7 Tagen gewonnenen Zellmenge zu den Kontrollen kaum Unterschiede (Siehe Abb.18). Bei einer Vorbehandlung mit 10^{-4}M Aescin hingegen wird das Zellwachstum auf ein Minimum reduziert.

Die s.c.-Behandlung (Rückenhaut) von tumortragenden Mäusen mit Aescin über einen Zeitraum von 6 Tagen hat keinen Einfluß auf das Zellwachstum (Siehe Abb.19). Die täglichen Gewichtsveränderungen während der Aescinbehandlung zeigt Abb.20. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen Kontrollgruppe und behandelten Mäusen.

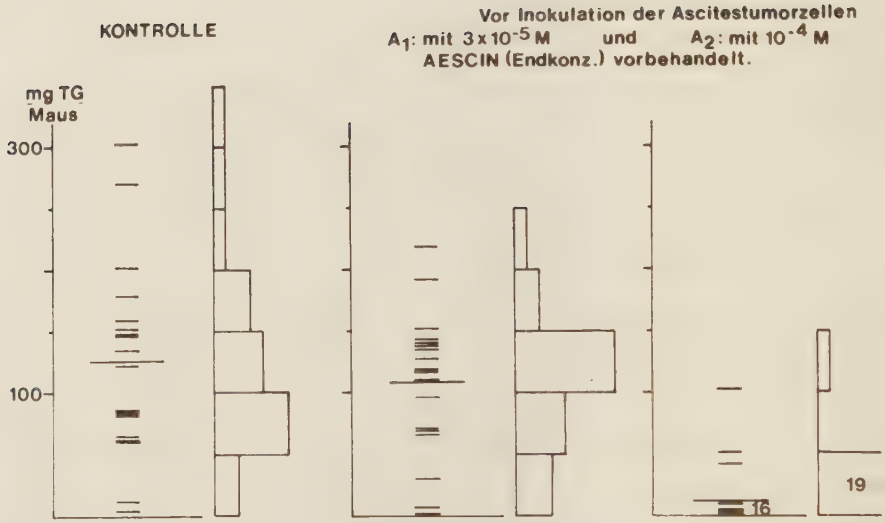


Abb.18: Yoshida Zellwachstum festgestellt 7 Tage nach Inokulation. Die linke Grafik zeigt jeweils mg TG Zellen pro Maus an; während die schräggestellten Säulen die Anzahl der Mäuse in der jeweiligen Gewichtsklasse angeben. (n = 18, resp. 20)

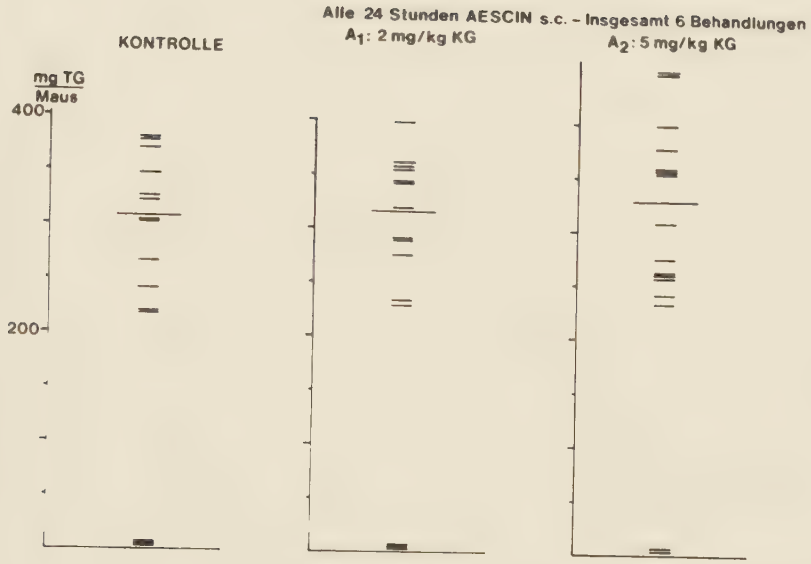


Abb.19: Yoshida Tumorwachstum über einen Zeitraum von 7 Tagen bei unterschiedlicher, täglicher Aescininjektion der Mäuse.
Die errechneten Mittelwerte schließen die Versager aus. (n = 15, resp. 16)

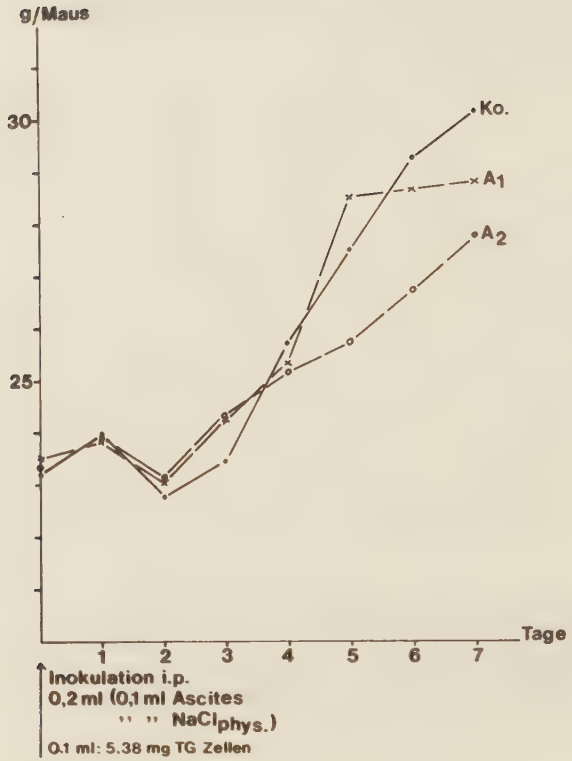


Abb.20: Gewichtsvergleich von drei Gruppen Mäusen (wie in Abb.19)

D. DISKUSSION

In dieser Arbeit mit Yoshida Ascites-Tumorzellen wird der Versuch unternommen, Wirkungen des Aescins auf Penetrationsvorgänge von denjenigen abzugrenzen, die sich am intrazellulären Stoffwechsel abspielen.

Die ersten eigenen Versuche zeigen, daß Aescin in einer Endkonzentration von 3 x 10^{-5}M die Glukoseaufnahme in die ATZ fast augenblicklich und vollständig hemmt. Ascitestumorzellen haben einen sehr großen Glukoseverbrauch; nach WARBURG u. HIEPLER (1952) kann eine Maus mit 5 ml Ascites und 250 mg Zellen maximal 40 - 45 mg/h Glukose aufnehmen und in Milchsäure überführen, während die Glukosemenge im gesamten Blut der Maus nur bei etwa 4 mg liegt. Andererseits sind ATZ in der Lage, bis zu einer Glukosekonzentration von 4 mg/100 ml die Glykolyse aufrechtzuerhalten (KEMP u. MANDEL, 1957). Nach WARBURG, WIND u. NEGELEIN (1926) sind ATZ auch ohne Glukose lebensfähig, wenn sie Sauerstoff zur Verfügung haben.

KOLBER u. LEFEVRE (1967) haben für den Transport an Tumorzellen in Analogie zu anderen Körperzellen ein Modell vorgeschlagen, wonach der Zucker beim Penetrationsvorgang eine Verbindung mit einem "Carrier" eingeht. Der so entstandene Zucker-Carrier-Komplex diffundiert zur Innenseite der Membran und gibt dort den Zucker frei. Als Begrenzungsfaktor des Transports gilt die Diffusionsrate dieses Komplexes durch die Membran. Hierbei würde es

sich also um eine erleichtere Diffusion handeln. Offenbar hängt aber der Aufnahmemechanismus von den in der Umgebung der Zellen vorliegenden Glukosekonzentrationen ab. So konnten SAHA u. COE (1967) zeigen, daß Glukose bei einer Konzentration >2 mM durch einfache Diffusion aufgenommen wird, <2 mM aber durch erleichterte Diffusion, die mit der Phosphorylierung koordiniert ist.
Selbst wenn zu Beginn des Versuches 2,7 mg/Ansatz zugegeben wurde (entsprechend einer Konzentration von 3 mM), entspricht somit die in der Inkubationsperiode vorliegende Glukosekonzentration weitgehend einer erleichterten Diffusion. Der Hemmeffekt des Aescins auf die Glukoseaufnahme kann daher als eine Hemmung der erleichterten Diffusion gedeutet werden.

Ob Ionenverschiebungen für die Beeinflussung der Glukosepermeabilität durch Aescin bedeutungsvoll sind, läßt sich vorerst nicht entscheiden. SIERING (1962) berichtet, daß durch Zugabe von Aescin zu Ehrlich ATZ (allerdings ohne genaue Angabe der Konzentration) zuerst Kalium aus den Zellen austritt und später Natrium und Wasser einströmen. Dabei verdreifacht sich der Na^+/K^+-Quotient außerhalb der Zellen. Mit dem Eintritt von Natrium und Wasser in die Zelle kommt es zu einem prolytischen Zustand, der nach jeder Inkubation mit Aescin sichtbar wird. Zugleich nimmt der Ca-Gehalt extrazellulär schnell ab, so daß bald nur noch Spuren vorhan-

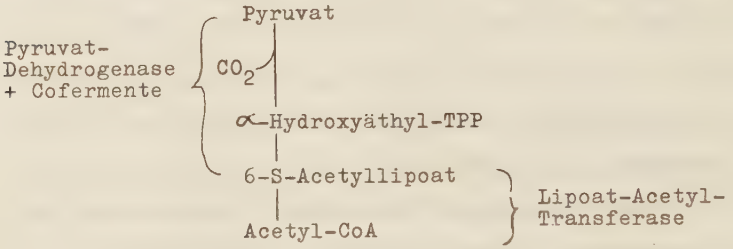
den sind. Derartige Ionenverschiebungen durch Aescin können sicherlich nicht nur eine Wirkung auf den Transport, sondern auch auf den intrazellulären Stoffwechsel wie z.B. die Atmung und Glykolyse ausüben (WENNER, 1967). BYGRAVE (1966) berichtet u.a., daß Ca-Ionen die Laktatbildung in Ehrlich ATZ herabsetzen und die Pyruvat-Kinase-Reaktion hemmen. Durch K-Ionen konnte die Hemmung der Glykolyse teilweise wieder aufgehoben werden.

Offenbar werden unter Aescin auch andere Transportleistungen in Mitleidenschaft gezogen. So fanden GRUBER (in Vorbereitung) den Transport von Aminosäuren und KOCHAN (in Vorbereitung) die Aufnahme von Purinbasen in die Tumorzellen gehemmt. Es dürfte sich auch aus diesem Grunde bei der Wirkung des Aescins auf die Glukoseaufnahme um einen Vorgang an der Membran handeln.

Die Ergebnisse der $^{14}CO_2$-Messung bei Angebot von (U-^{14}C)-Glukose deuten darauf hin, daß die Verwertung der Glukose nicht nur von der Penetration in die Zellen abhängig ist. Sie zeigen unter 3 x 10^{-5}M Aescin eine Hemmung von 66-93 %, je nach Zeitpunkt der Messung. Die Hemmung der Glukoseaufnahme betrug nach 40 Minuten ca. 80 %; während die Hemmung der CO_2-Bildung zum gleichen Zeitpunkt 93 % ausmachte.

Der überwiegende Teil der Glukose durchläuft die Glykolyse und nur etwa 1 % mündet in den oxydativen Pentosephosphatweg (BRAND u. DECKNER, 1970); außerdem wird ein Teil für

die Glykogensynthese benötigt (NIGAM, 1969). Es kann demnach davon ausgegangen werden, daß ein großer Teil des gebildeten CO_2 über die aerobe Glykolyse aus der Pyruvatdecarboxylierung und aus dem Zitronensäurezyklus stammt (HEPP, PRÜSSE, WEISS u. WIELAND, 1966). Ausgehend vom Pyruvat werden folgende erste Reaktionsschritte durchlaufen:



Die Ergebnisse der $^{14}CO_2$-Bildung aus (1-^{14}C)-Pyruvat mit intakten ATZ zeigen, daß Aescin eine Hemmung von 92 % bewirkt. Im zeitlichen Verlauf weicht die $^{14}CO_2$-Bildung unter Aescin erst nach ca. 15 Minuten von den Kontrollwerten ab. Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen der $^{14}CO_2$-Bildung aus (U-^{14}C)-Glukose, bei der von Anfang an eine stärkere Hemmung unter Aescin zu beobachten ist (Siehe Abb.7 u. 8).

Die verzögerte Hemmung der $^{14}CO_2$-Bildung aus Pyruvat unter Aescin könnte an einer zunehmenden Verminderung des Pyruvattransfers in die Zelle, einer sich erst allmählich auswirkenden Verminderung der Pyruvatverwertung oder an einem behinderten Ausstrom des Reaktionsproduktes

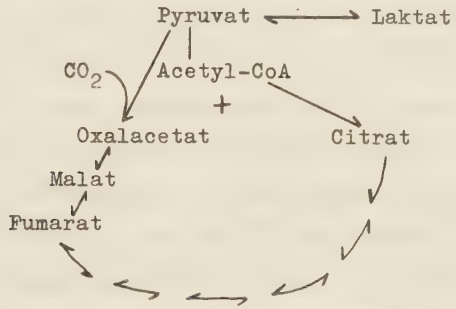
aus der Zelle liegen. Offenbar wird aber die Aktivität der Pyruvatdehydrogenase unter Aescin nicht eingeschränkt, denn die Bildung von $^{14}CO_2$ bei Zugabe von (1-^{14}C)-Pyruvat zum Homogenat erfolgt in gleicher Größenordnung wie bei intakten Zellen, wird aber durch Aescin nicht wesentlich beeinflußt.

Das im enzymatischen Gleichgewicht mit Pyruvat stehende Laktat wurde unter Bedingungen gemessen, die die Berücksichtigung der Zellschranken umgehen. Im Homogenat wurde bei Anwesenheit von Aescin 50 - 92 % weniger Laktat gefunden. Wurde das Homogenat ohne Glukose inkubiert, so ergab sich zwar insgesamt eine geringere Laktatmenge (7,49 µmol Laktat mit Glukose und 5.08 µmol ohne Glukosezusatz), die Verminderung durch Aescin blieb jedoch signifikant. Aescin wirkt sich auf die Laktatmenge also auch unabhängig von der zugegebenen Glukose aus. Je nach Versuchsbedingungen kann das gebildete Laktat aus verschiedenen Quellen stammen: Bei hohem Glukoseangebot stammen 80 % des Laktats aus der verstoffwechselten Glukose, bei einer Konzentration weit unter 4 µmol Glukose/ml Zellen kann die Laktatbildung jedoch höher als die Aufnahme der Glukose sein (COE et al., 1966). Die Laktatbildung ohne zugegebene Substrate läßt an die Verstoffwechslung eines endogenen Substrates denken. Dies können Aminosäuren, Fettsäuren o.ä. sein, die über Acetyl-CoA in den allgemeinen Stoffwechselpool gelangen (ASHFORD u. HOLM, 1931). Natürlich könnten bei diesen Versuchen

mit Glukose auch andere Schritte z.B. die Phosphorylierung durch Hexokinase betroffen sein, der eine besondere Bedeutung zugeschrieben wird (KNOX et al., 1970). Nach DAVIDOVA (1968) scheint dieses Enzym in Hepatomen sogar an der Plasmamembran lokalisiert zu sein. Andererseits muß nach MCCOMB u. YUSHOK (1959); KOSOW u. ROSE (1968) mit dem Vorkommen von Hexokinase in den Mitochondrien gerechnet werden. Der Zusatz dieses Enzyms zum Homogenat zeigte jedoch keine Veränderungen der Laktatmengen die zwischen Kontrolle und Aescin auftraten. Desgleichen war es nicht möglich, wesentliche Unterschiede im Verbrauch von ATP oder anderen in der Glykolyse auftretenden Substrate (G6P, FDP und PEP) zur Erklärung der unterschiedlichen Laktatmengen heranzuziehen.

In der aeroben Glykolyse der Tumorzelle entsteht neben Laktat, wie schon WIELAND (1966) aufgefallen war, auch Essigsäure in kleinen, aber konstanten Mengen. Er zeigte außerdem, daß es nach Pyruvatzusatz zu einer Erniedrigung von Laktatkonzentrationen kommt; und weiter, daß bei Inkubation unter Stickstoff das gesamte Pyruvat zu Laktat umgewandelt wird. Beim Vergleich der Auswirkungen von Aescin auf die Laktatwerte in Sauerstoff- und Stickstoffatmosphäre zeigte sich, daß unter Stickstoff und Sauerstoff kein Unterschied mehr zu erkennen war. Offenbar kam durch die Versuchsanordnung bei der anstelle des bisher verwendeten Bikarbonatpuffers ein bikarbonatfreier Phosphatpuffer verwendet wurde, noch ein weiterer wesent-

licher Faktor für die Beeinflussung des Aescins auf die Laktatmenge zur Auswirkung. Dies könnte möglicherweise mit der Pyruvatverwertung in Zusammenhang stehen. Entsprechend dem folgenden Schema kann Pyruvat unter CO_2-Aufnahme in Oxalacetat umgewandelt werden:



Nach KEECH u. UTTER (1963) läuft die sogenannte CO_2-fixation nach folgender Gleichung ab

$$\text{Pyruvat} + CO_2 \xleftarrow[\text{Pyruvatcarboxylase}]{\text{Acetyl-CoA}} \text{Oxalacetat}$$

nach COOPER et al.(1968) wird mit HCO_3^- fixiert.

In den Versuchen, die die Erfassung der CO_2-Fixation zum Ziele hatten und in denen radioaktives Bikarbonat intakten Zellen angeboten wurde, ergaben sich folgende Befunde: Die in die Zelle eingetretene radioaktive Substanz findet sich nach Zerstörung der Zellen in einer Form vor, die durch Säure nicht ausgetrieben werden kann und somit Umwandlungsprodukt des Bikarbonats darstellt. Aescinzusatz zur Inkubation senkt den Anteil dieses sogenannten Fixationsproduktes um fast 95 %.

Ein ähnliches Bild ergibt sich für die Radioaktivität der partikulären Fraktionen. Daß es sich bei diesem Fixationsprodukt um Säuren handelt, wurde durch Filtration über einen Anionenaustauscher bewiesen. Offenbar ist aber das für die CO_2-Fixation wichtige Enzym, die Pyruvatcarboxylase, die vorwiegend in den Mitochondrien vorkommt (KEECH u. UTTER, 1963; BÖTTGER u. WIELAND, 1969), durch Aescin nicht hemmbar. Denn an einer Präparation von Lebermitochondrien, die empfindlich gegenüber MICA (5-Methoxyindol-2-carbonsäure) reagierte (BAUMANN u. HILL, 1968), hemmt Aescin in 3 x 10^{-5}M Endkonzentration die CO_2-Fixation nicht. Die Werte liegen nach 10 und 20 Minuten sogar leicht höher als die der Kontrolle. Möglicherweise beeinflußt Aescin den Übergang von Bikarbonat in die Zelle oder seine Ausnutzung für die mitochondriale Verwertung innerhalb der intakten Zelle. Lebermitochondrien wurden deshalb genommen, da die Gewinnung brauchbarer Mitochondrienfraktionen aus Tumorzellen bisher nicht befriedrigend gelöst ist.

Um die Mitochondrienfunktion noch auf anderem Wege zu überprüfen, wurde die Atmung unter Aescin gemessen. Dabei zeigte sich eine starke Verringerung der O_2-Aufnahme 20 Minuten nach Aescinzugabe, obwohl die Zellen unter den Kontrollbedingungen über mehrere Stunden konstante O_2-Mengen aufzunehmen vermögen (LETTRÉ u. RIED, 1957). Eine Glukosezugabe verändert die Hemmung der

Zellatmung durch Aescin nicht. Die anschließende Betrachtung der Zellen, insbesondere ihrer Mitochondrien, unter dem Elektronenmikroskop ließ keine pathologisch morphologischen Veränderungen erkennen. Die einzigen auf diesem Wege faßbaren Unterschiede nach Aescininkubation bestehen in dem Verlust der Mikrovilli der Zellmembran und einer Ansammlung von Flüssigkeit im Zellinnern.

Die beschriebenen Versuche lassen erkennen, daß das Saponin Aescin den Übertritt von Substanzen, insbesohdere der Glukose in die Zelle behindert. Offenbar werden darüberhinaus auch Veränderungen im Zellstoffwechsel erkennbar, die sich bisher nicht zwanglos durch Hemmung einzelner Stoffwechselschritte deuten lassen. Es muß daran gedacht werden, daß ähnlich wie beim Transport von Glukose, Aminosäuren und Basen auch andere Substrate wie z.B. Pyruvat und Bikarbonat die Zellmembran weniger leicht passieren könnten.

Eine solche Annahme läßt erklären, warum Pyruvatdecarboxylierung und CO_2-Fixation so stark gehemmt erscheinen, obwohl die entsprechenden Enzymsysteme von Aescin nicht direkt beeinflußt werden. In diesem Zusammenhang sind die Versuche an Fettgewebszellen besonders bedeutsam (GRUBER, HEIN, v.BRUCHHAUSEN, 1971), die sich nur deuten lassen, wenn man in Analogie zu den Wirkungen des Insulins zumindest eine Umorientierung der Membran unter der Einwirkung des Saponins annimmt.

WALLACH (1968) hat auch bei der Tumorzelle die Zellmembran für die Tumoreigenschaften in den Vordergrund gestellt.

Meine Versuche über die Transplantierbarkeit vorbehandelter Zellen zeigen allerdings, daß unter der zumeist gewählten Konzentration von 3 x 10^{-5}M Aescin nicht genügend Zellen geschädigt werden, um das Anwachsen in der Bauchhöhle der Maus nachhaltig herabzusetzen. Erst mit 10^{-4}M Aescin ist dies möglich, einer Konzentration, die eine weitgehende Schädigung der Zellen auch morphologisch erkennen läßt.
Offenbar zeigen Tumorzellen auch keine größere Empfindlichkeit als normale Gewebszellen, denn bei parenteraler Applikation von Aescin an tumortragende Mäuse mit einer Dosierung, die dicht unter der letalen Dosis liegt, gleichen die Tumorzellzahlen denen der Kontrollmäuse.

Zusammengefaßt kann ausgesagt werden, daß Aescin außer Wirkungen auf Transportvorgänge in der Zellmembran auch Veränderungen in Stoffwechselvorgängen innerhalb der Zelle hervorrufen kann.

E. ZUSAMMENFASSUNG

1. Die Wirkung von Aescin wurde an intakten Ascites-Tumorzellen, Homogenaten und Mitochondrien untersucht. Die Glukoseaufnahme der Ascites-Tumorzelle wurde durch die Messung der Glukoseabnahme im Außenmedium bestimmt und die $^{14}CO_2$-Abgabe aus (U-^{14}C)-Glukose und (1-^{14}C)-Pyruvat gemessen. Weiterhin wurde versucht, die $^{14}CO_2$-Fixation aus (^{14}C)-$NaHCO_3$ zu bestimmen. Außerdem wurde die Atmung der ATZ mit und ohne Glukose gemessen. Elektronenoptische Aufnahmen wurden zur Klärung morphologischer Veränderungen an Zellen und Zellorganellen angefertigt.

2. Aescin hemmt die Glukoseaufnahme in die Ascites-Tumorzelle. Die Mindestkonzentration des Aescins liegt bei 3×10^{-5}M (Endkonzentration). Die Hemmung der $^{14}CO_2$-Bildung aus (U-^{14}C)-Glukose ist im Vergleich zur Hemmung der Glukoseaufnahme ausgeprägter und setzt sofort ein. Dagegen weist die Hemmung der $^{14}CO_2$-Bildung aus (1-^{14}C)-Pyruvat eine Verzögerung von 15 Minuten auf. Diese Hemmung durch Aescin (3×10^{-5}M) ist im Homogenat nicht mehr nachweisbar. Der Laktatgehalt sinkt durch Aescin bei Inkubation intakter Zellen sowie bei Inkubation eines zellfreien Homogenats ab. Das Absinken des Laktatgehaltes tritt in Sauerstoff- und Stickstoff-Atmosphäre nicht auf, wenn ein bikarbonatfreies Medium verwendet wird.

3. Die CO_2-Fixation aus (^{14}C)-$NaHCO_3$ in Tumorzellen wird durch die Zugabe von Aescin (3×10^{-5}M) stark herabgesetzt. An Lebermitochondrien von Ratten kann eine solche Hemmung nicht mehr nachgewiesen werden. Die Atmung wird 20 Minuten nach Zugabe von Aescin fast bis zum Stillstand gehemmt. Trotzdem finden sich nach Aescinbehandlung keine morphologisch faßbaren Veränderungen an den Mitochondrien der ATZ. Lediglich die Mikrovilli der Zellmembran sind verschwunden.

4. Das Anwachsen der Tumorzellen im Bauchraum der Maus nach Vorbehandlung mit Aescin 3×10^{-5}M Konzentration bleibt unbeeinflußt; erst eine Vorbehandlung mit 10^{-4}M verhindert ein Anwachsen fast vollständig. Die Unterdrückung des Tumorwachstums nach parenteraler Applikation von Aescin an tumortragende Mäuse ist selbst bei nahezu letaler Dosis nicht möglich.

5. Das Saponin Aescin hemmt somit den Transport verschiedener Substrate in die Ascites-Tumorzelle. Außerdem können Veränderungen intrazellulärer Stoffwechselvorgänge hervorgerufen werden.

F. LITERATURVERZEICHNIS

ASHFORD, C.A. and E.G.HOLMES: Further observations on the oxidation of lactic acid by brain tissue. Biochem. Z. 25, 2o28 - 2o49 (1931)

BARGONI, N., M.A.GRILLO, M.T.RINAUDO und T.FOSSA: Über den Kohlenhydrat-Stoffwechsel in der Leber und in der Niere von mit Propylthiourazil oder Schilddrüse gefütterten Ratten. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 349, 275 - 278 (1968)

BAUMANN, N. and C.J.HILL: Inhibition of gluconeogenesis and α-keto oxidation by 5-methoxyindole-2-carboxylic acid. Biochemistry 7, 1322 - 1327 (1968)

BENADE, L., T.HOWARD and D.BURK: Synergistic killing of Ehrlich ascites carcinoma cells by ascorbate and 3-amino-1,2,4-triazole. Oncology 23, 33 - 43 (1969)

BÖTTGER, I. and O.WIELAND; D.BRDICZKA and D.PETTE: Intracellular localization of pyruvate carboxylase and phosphoenolpyruvate carboxykinase in rat liver. Europ. J. Biochem. 8, 113 - 119 (1969)

BRAND, K. and K.DECKNER: Quantitative relationship between the pentose phosphate pathway and the nucleotide synthesis in ascites tumor cells. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 351, 711 - 717 (1970)

BYGRAVE, F.L.: The effect of calcium ions on the glycolytic activity of Ehrlich ascites-tumour cells. Biochem. J. 1o1, 48o - 486 (1966)

COE, E.L., K.H.IBSEN, M.DIXON and R.W.MCKEE: Glycolysis of small amounts of glucose by Ehrlich ascites-tumour cells. Cancer Res. 26 (I), 276 - 281 (1966)

COOPER, T.G., T.T.TCHEN, H.G.WOOD and C.R.BENEDICT: The carboxylation of phosphoenol-pyruvate and pyruvate. J. biolog. Chem. 243, 3857 - 63 (1968)

CRABTREE, H.G.: Observations on the carbohydrate metabolism of tumors. Biochem. J. 23, 536 - 45 (1929)

DAVIDOVA, S.Y.: Hexokinase activity and glycolytic capacity of plasma membranes of hepatomas. Biochim. Biophys. Acta 158, 3o3 - 3o5 (1968)

GRUBER,K., I.HEIN und F.v.BRUCHHAUSEN: Über die Wirkungen von Aescin auf den Glucosetransport ins Fettgewebe und in Ascites-Tumor-Zellen. (in Vorbereitung)

GRUBER, K.: Dissertation (in Vorbereitung)

GUMINSKA, M.: Uptake and utilization of 2-phosphoenol-pyruvate (PEP) by malignant cells. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 126, 797 - 8o1 (1967)

HANSON, R.L., P.D.RAY, P.WALTER and H.A.LARDY: Mode of action of hypoglycemic agents. J. Biolog. Chem. 244, 4351 - 4359 (1969)

HEPP, D., E.PRÜSSE, H.WEISS und O.WIELAND: Essigsäure als Endprodukt des aeroben Krebsstoffwechsels. Biochem. Z. 344, 87 - 1o2 (1966)

HOLZER, H.: Intrazelluläre Regulation des Stoffwechsels. Naturwissenschaften 5o, 26o - 269 (1963)

KEECH, D.B. and M.F.UTTER: Pyruvate carboxylase. J. Biol. Chem. 238, 2603 - 14 (1963)

KEMP, A. and B.MENDEL: How does the Ehrlich ascites tumor cell obtain its energy for growth? Nature 180, 131 - 132 (1957)

KLINGENBERG, M.: Substrat-Permeation in Mitochondrien mit besonderer Berücksichtigung der Permeation von Pyruvat. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 351, 275 - 277 (1970)

KNOX, W.E., S.C.JAMDAR and P.A.DAVIS: Hexokinase, differentiation and growth rates of transplanted rat tumors. Cancer Res. 30, 2240 - 2244 (1970)

KOCHAN, M.: Dissertation (in Vorbereitung)

KOLBER, A.R. and P.G.LEFEVRE: Evidence for carrier-mediated transport of monosaccharides in the Ehrlich ascites tumor cell. J. General Physiol. 50/7, 1907 - 1928 (1967)

KOSOW, D.P. and I.A.ROSE: Ascites tumor mitochondrial hexokinase II. J. Biolog. Chem. 243, 3623 - 30 (1968)

LETTRÉ, H. und H.RIED: Zum Stoffwechsel der Zellen des Ehrlichschen Mäuse-Ascites-Tumors in vitro. Naturwissenschaften 44, 382 - 383 (1957)

MCCOMB, R.B. and W.D.YUSHOK: Properties of particulate hexokinase of the krebs-2-ascites tumor. Biochim. Biophys. Acta 34, 515 - 26 (1959)

NAKAMURA, W.: The absence of glucose in Ehrlich ascites tumor cells and fluid. Biochim. Biophys. Acta 158, 212 - 218 (1968)

NIGAM, V.N.: Pathways of glycogen synthesis in Novikoff ascites hepatoma cells. Biochem. J. 115, 315 - 22 (1969)

PATEL, M.S. and R.W.HANSON: Carboxylation of pyruvate by isolated rat adipose tissue mitochondria. J. biol. Chem. 245, 1302 - 10 (1970)

SAHA, I. and E.L.COE: Evidence indicating the existence of two modes of glucose uptake in Ehrlich ascites tumor cells. Biochem. and Biophys. Res. Com. 26/4, 441 - 446 (1967)

SIERING, H.: Permeabilitätsbeeinflussungen des Ehrlich-schen Mäuse-Ascites-Carcinoms. Naturwissenschaften 49, 499 (1962)

SIERING, H.: Permeabilitätsuntersuchungen am Ehrlich-schen Mäuse-Ascites-Carcinom. Naturwissenschaften 49, 63 (1962)

TIEDEMANN, H. und J.BORN: Über die Steuerung des Glucose-abbaus in Ascites-Tumorzellen. Ein Beitrag zum Mechanismus der Pasteur Reaktion. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 321, 205 - 22 (1960)

UMBREIT, W.W., R.H.BURRIS and J.F.STAUFFER: Manometric techniques and tissue metabolism. (1951)

WALLACH, Holzl D.F.: Generalized membrane defects in cancer. New Engl. J. Med. 280, 761 - 767 (1969)

WARBURG, O.: On the origin of cancer cells. Science 123, 309 - 314 (1956)

WARBURG, O.: Versuche an überlebendem Carcinomgewebe (Methoden). Biochem. Z. 142, 317 - 333 (1923)

WARBURG, O.: Verbesserte Methode zur Messung der Atmung und Glykolyse. Biochem. Z. 152, 51 - 63 (1924)

WARBURG, O. und E.HIEPLER: Versuche mit Ascites-Tumorzellen. Z. Naturforschung 76, 193 (1952)

WARBURG, O. und S.MINAMI: Versuche an überlebendem Carcinomgewebe. Klin. Wochenschr. 2, 776 (1923)

WARBURG, O., F.WIND und E.NEGELEIN: Über den Stoffwechsel von Tumoren im Körper. Klin. Wo. 5, 829 - 832 (1926)

WENNER, C.E.: Progress in tumour enzymology. Adv. in Enzymol. 29, 321 - 390 (1967)

WIELAND, O.: Zur Biochemie der Tumorzelle. Münch. Med. Wochenschr. 108/II, 1653 - 61 (1966)

WU, R. and E.RACKER: Regulatory mechanism in carbohydrate metabolism. J. biol. Chem. 234, 1029 - 35 (1959)

WULFF, G. und R.TSCHESCHE: Über die Struktur der Roßkastaniensaponine (Aescin) und die Aglykone verwandter Glykoside. Tetrahedron. 25, 415 - 436 (1969)

Herrn Professor Dr. med. Hans Herken
danke ich für die Überlassung des
Themas, und Herrn Professor Dr. med.
Franz von Bruchhausen danke ich für
die wissenschaftliche Betreuung bei
der Durchführung dieser Arbeit.

L e b e n s l a u f

Am 9. Januar 1937 wurde ich, Ingeborg Rosina Hein, in Kaiserswaldau/Riesengebirge als Tochter des Kunstmalers und Maurers Gerhart Hein und seiner Ehefrau Elisabeth, geb. Friedrichs, geboren.

Meine Einschulung erfolgte 1943 in Wernersdorf/ Schlesien; 1951 ging ich in Eschenbach/Mfr.Bayern ab. Nach Handelsschulbesuch und kaufmännischer Lehre war ich kaufmännische Angestellte in Nürnberg und fremdsprachliche Sekretärin in Berlin.

Im November 1964 bestand ich das externe Abitur, nach Abendunterricht an Gabbes Lehranstalten. Von WS 1964/65 bis WS 1970/71 studierte ich Human-Medizin an der Freien Universität Berlin, an der ich im März 1971 das Staatsexamen für Medizin bestand.

Seit 1. April 1971 bin ich als Medizinalassistentin am Pharmakologischen Institut der Freien Universität Berlin tätig. Dort begann ich die vorgelegte Arbeit im November 1968.

Druck: Dissertationsdruckstelle, 1 Berlin 33, Garystr. 45